

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 311**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2003 E 10179942 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2289936**

54 Título: **Variantes de inmunoglobulina y usos de las mismas**

30 Prioridad:

16.12.2002 US 434115 P

01.12.2003 US 526163 P

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

20.09.2017

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

ADAMS, CAMELLIA, W.;

CHAN, ANDREW, C.;

CROWLEY, CRAIG, W.;

LOWMAN, HENRY, B.;

NAKAMURA, GERALD, R. y

PRESTA, LEONARD, G.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 633 311 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

Variantes de inmunoglobulina y usos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a anticuerpos dirigidos contra CD20, y a su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con las células B.

10 **Antecedentes de la invención**

Los linfocitos son una de las diferentes poblaciones de glóbulos blancos de la sangre; reconocen y responden de forma específica los antígenos extraños. Las tres clases principales de linfocitos son los linfocitos B (células B), linfocitos T (células T) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Los linfocitos B son las células responsables de la producción de anticuerpos y proporcionan inmunidad humoral. Las células B maduran en el interior de la médula ósea y abandonan la médula expresando un anticuerpo de unión al antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B no expuesta encuentra por primera vez el antígeno para el que es específico el anticuerpo unido a su membrana, la célula comienza a dividirse rápidamente y su progenie se diferencia en células B de memoria y células efectoras denominadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen una vida útil más larga y siguen expresando el anticuerpo unido a membrana con la misma especificidad que la célula progenitora original. Las células plasmáticas no producen el anticuerpo unido a membrana pero, en su lugar, producen una forma secretada del anticuerpo. Los anticuerpos secretados son las principales moléculas efectoras de la inmunidad humoral.

El antígeno CD20 (también denominado antígeno de diferenciación restringida de los linfocitos B humanos, Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD situada en los prelinfocitos B y los linfocitos B maduros (Valentine et al. J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287 (1989); y Einfeld et al. EMBO J. 7(3):711-717 (1988)). El antígeno se expresa también en máster del 90 % de linfomas de células B no de Hodgkin (LNH) (Anderson et al. Blood 63(6):1424-1433 (1984)), pero no se encuentra en los citoblastos hematopoyéticos, procélulas B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder et al. J. Immunol. 135(2):973-979 (1985)). Se cree que CD20 regula una o varias etapas tempranas del proceso de activación del inicio del ciclo celular y la diferenciación (Tedder et al., *supra*) y posiblemente funciona como un canal de iones calcio (Tedder et al. J. Cell. Biochem. 14D:195 (1990)).

Dada la expresión de CD20 en linfomas de células B, este antígeno ha sido una diana terapéutica útil para tratar este tipo de linfomas. Hay más de 300.000 personas en Estados Unidos con LNH de células B, y cada año se diagnostican más de 56.000 nuevos casos. Por ejemplo, el anticuerpo rituximab (RITUXAN®) que es un anticuerpo monoclonal de murino/humano diseñado mediante ingeniería genética dirigido contra el antígeno CD20 humano (comercialmente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, EE.UU.) se utilizar para el tratamiento de pacientes con linfoma de células B no de Hodgkin positivo para CD20 de bajo grado o folicular con recidiva o resistente al tratamiento. Rituximab es el anticuerpo que se cita como "C2B8" en la patente de Estados Unidos n.º 5.736.137 concedida el 7 de abril de 1998 (Anderson et al.) y en la patente de Estados Unidos n.º 5.776.456. Los estudios realizados *in vitro* sobre el mecanismo de acción han demostrado que RITUXAN® se une al complemento humano y lisa las líneas de células B linfoides a través de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Reff et al. Blood 83(2):435-445 (1994)). Además, tiene una actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Los estudios preclínicos realizados *in vivo* han mostrado que RITUXAN® agota las células B de la sangre periférica, de los ganglios linfáticos y de la médula ósea de los macacos, supuestamente mediante procesos mediados por células y el complemento (Reff et al. Blood 83(2):435-445 (1994)). Otros anticuerpos dirigidos contra CD20 indicados para el tratamiento del LNH incluyen el anticuerpo murino Zevalin™ que está vinculado al radioisótopo itrio-90 (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA), Bexxar™ que es otro anticuerpo totalmente murino conjugado con 1-131 (Corixa, WA).

Una limitación importante del uso de anticuerpos murinos en terapia humana es la respuesta humana contra el anticuerpo de ratón (HAMA) (véase, por ejemplo, Miller, R.A. et al. "Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma" Blood, 62:988-995, 1983; y Schroff, R.W., et al. "Human anti-murine immunoglobulin response in patients receiving monoclonal antibody therapy" Cancer Res., 45:879-885, 1995). El documento US 5576195 describe un anticuerpo dirigido contra CD20 quimérico con CDR representadas según las SEQ ID NO 4, 5, 6 y 10, 11 y 12 descritas en el presente documento. Incluso las moléculas quiméricas, donde los dominios variables (V) de los anticuerpos de roedor están fusionados a regiones constantes (C) humanas, siguen siendo capaces de suscitar una respuesta inmunitaria significativa (HACA, anticuerpo humano dirigido contra la quimera, por sus siglas en inglés) (Neuberger et al. Nature (Lond.), 314:268-270, 1985). Un potente enfoque para superar estas limitaciones en el uso clínico de los anticuerpos monoclonales es la "humanización" del anticuerpo murino o el anticuerpo procedente de una especie no humana (Jones et al. Nature (Lond), 321:SZ2-525, 1986; Riechman et al., Nature (Lond), 332:323-327, 1988).

Por lo tanto, es beneficioso producir anticuerpos terapéuticos contra el antígeno CD20 que produzcan poca o ninguna antigenicidad cuando se administran a pacientes, especialmente para el tratamiento crónico. La presente

invención satisface estas y otras necesidades. La presente invención proporciona anticuerpos dirigidos contra CD20 que superan las limitaciones de las actuales composiciones terapéuticas, y ofrecen al mismo tiempo ventajas adicionales que serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente.

5 Sumario de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos de unión contra el CD20 humano o fragmentos funcionales de los mismos como se define en la reivindicación 1, y se refiere a su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a células B. Estos anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos dirigidos contra CD20 descritos en el presente documento pueden comprender además cambios en los restos de aminoácido en la región Fc que dan lugar a una función efectora mejorada, incluyendo una función de CDC y/o ADCC mejorada y la eliminación de células B (también denominada en el presente documento como agotamiento de células B). Los anticuerpos dirigidos contra CD20 de la invención incluyen los que tienen cambios específicos que mejoran la estabilidad. Las variantes 2H7 humanizadas con mayor estabilidad son como se describe en el ejemplo 6, más adelante. Se describen en el presente documento variantes deficientes en fucosa que tienen una función ADCC *in vivo* mejorada.

En una realización preferida de todas las composiciones de anticuerpo y los métodos de uso de la presente invención, el anticuerpo de unión a CD20 humanizado es 2H7.v16 que tienen la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de la SEQ ID NO. 21 y 22, respectivamente, como se muestra en la Fig. 6 y la Fig. 7. Cuando se hace referencia a las secuencias polipeptídicas de las Figuras 6, 7 y 8, se deberá entender que los primeros 19 aminoácidos, o así, que forman la secuencia de señal secretora no están presentes en el polipéptido maduro. La región V de todas las demás variantes basadas en la versión 16 tendrán las secuencias de aminoácidos de la v16, salvo en las posiciones de las sustituciones de aminoácidos que se hayan indicado en la divulgación. Salvo que se indique otra cosa, las variantes 2H7 tendrán la misma cadena L que v16.

La invención proporciona un anticuerpo humanizado que se une al CD20 humano, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se define en las reivindicaciones, en donde el anticuerpo es eficaz para agotar las células B de primate *in vivo*, comprendiendo el anticuerpo en su región variable de cadena H (V_H) al menos una secuencia CDR3 de la SEQ ID NO. 12 procedente de un anticuerpo dirigido contra CD20 humano y los restos del marco de consenso (FR) humano del subgrupo III de la cadena pesada humana (V_{HIII}). En una realización, las células B de primate proceden de ser humano y de macaco. El anticuerpo comprende además la secuencia de la CDR1 de la cadena H de la SEQ ID NO. 10 y la secuencia de la CDR2 de la SEQ ID NO. 11 y comprende además la secuencia de la CDR1 de la cadena L de la SEQ ID NO. 4, la secuencia de la CDR2 de la SEC ID NO. 5, la secuencia de la CDR3 de la SEC ID NO. 6 con los restos del marco de consenso (FR) humano del subgrupo I de la cadena ligera humana K I (V_{KI}).

El anticuerpo de la presente invención comprende la secuencia de V_H de la SEQ ID NO.8 de v16, tal como se muestra en la Figura 1B. En una realización adicional de lo anterior, el anticuerpo comprende además la secuencia de V_L de la SEQ ID NO.2 de v16, tal como se muestra en la Figura 1A.

En otras realizaciones, el anticuerpo humanizado es 2H7.v31 que tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de la SEQ ID 21 y 23, respectivamente, como se muestra en la Fig. 6 y en la Fig. 8; 2H7.v31 que tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID NO. 23 como se muestra en la Fig. 8; 2H7.v96 con las sustituciones de aminoácidos D56A y N100a en la cadena H y S92A en la cadena L de v16.

En realizaciones separadas, el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores comprende además al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejora la actividad ADCC y/o CDC con respecto a la del anticuerpo original o precursor del que se deriva, siendo v.16 el anticuerpo precursor con el que se realiza la comparación en la mayoría de los casos, y Rituxan en otros casos. Uno de estos anticuerpos con actividad mejorada comprende la triple sustitución con alanina de S298A/E333A/K334A en la región Fc. Un anticuerpo que tiene la sustitución S298A/E333A/K334A es 2H7.v31 que tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID NO. 23.

En otra realización, el anticuerpo comprende además al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que disminuye la actividad CDC en comparación con el anticuerpo precursor del que se deriva que, en la mayoría de los casos, es v16. Uno de estos anticuerpos con una actividad CDC reducida en comparación con v16 comprende al menos la sustitución K322A en la cadena H. La comparación de la actividad ADCC y CDC se puede someter a ensayo como se describe en los ejemplos.

En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos de longitud completa en los que la región V_H está unida a una región constante de la cadena pesada de la IgG humana. En realizaciones preferidas, la IgG es la IgG1 o la IgG3 humanas.

En una realización, el anticuerpo de unión a CD20 está conjugado con un agente citotóxico. En realizaciones preferidas, el agente citotóxico es una toxina o un isótopo radioactivo.

En una realización, los anticuerpos de la invención para su uso con fines terapéuticos o de diagnóstico se producen en células CHO.

5 También se proporciona una composición que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones anteriores, y un transportador. En una realización, el transportador es un transportador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones se pueden proporcionar en un artículo de fabricación o un kit.

10 La invención también proporciona una formulación líquida que comprende un anticuerpo 2H7 humanizado a 20 mg/ml de anticuerpo, sulfato de histidina 10 mM pH 5,8, 60 mg/ml de sacarosa (6 %), 0,2 mg/ml polisorbato 20 (0,02 %).

La invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos divulgados en el presente documento, incluido un vector de expresión para expresar el anticuerpo.

15 Otro aspecto de la invención son las células hospedadoras que comprenden los anteriores ácidos nucleicos, y las células hospedadoras que producen el anticuerpo. En una realización preferida de esto último, la célula hospedadora es una célula CHO. Se proporciona un método para producir estos anticuerpos, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora que produce el anticuerpo, y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

20 Otro aspecto más de la invención es un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende un anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriores. Para su uso en el tratamiento del LNH, el artículo de fabricación comprende además un prospecto que indica que la composición se utiliza para tratar el linfoma no de Hodgkin.

25 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para inducir la apoptosis de células B in vivo, que comprende poner en contacto las células B con el anticuerpo de cualquiera de lo anterior, destruyendo de esta forma las células B.

30 La invención también se refiere a métodos para tratar las enfermedades divulgadas en el presente documento mediante la administración de un anticuerpo de unión a CD20 o fragmento funcional del mismo, a un mamífero tal como un paciente humano que padece la enfermedad. En los métodos para tratar una enfermedad autoinmunitaria o un cáncer positivo para CD20, el anticuerpo puede ser 2H7.v16 que tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de la SEQ ID NO. 21 y 22, respectivamente, como se muestra en la Fig. 6 y la Fig. 7. Por lo tanto, un método para tratar el cáncer positivo para CD20, puede comprender administrar a un paciente que padece el cáncer, 35 una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de unión a CD20 humanizado de la invención. El cáncer positivo para CD20 puede ser un linfoma de células B o una leucemia, incluido el linfoma no de Hodgkin (LNH) o la enfermedad de Hodgkin con predominancia de linfocitos (LPHD), leucemia linfocítica crónica (CLL) o SLL. En un método para tratar un linfoma o leucemia de células B, el anticuerpo se puede administrar en un intervalo de dosificación de aproximadamente 275-375 mg/m². El método de tratamiento puede comprender además administrar al paciente al menos un agente quimioterapéutico, en el que para el linfoma no de Hodgkin (LNH), el agente 40 quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y prednisolona.

45 Un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria puede comprender administrar a un paciente que padece la enfermedad autoinmunitaria, una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de unión a CD20 humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores. La enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus sistémico eritematoso (LSE), enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjorgen y glomerulonefritis. Cuando la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide, el anticuerpo se puede administrar 50 junto con un segundo agente terapéutico, que es preferentemente metotrexato.

55 En estos métodos de tratamiento, los anticuerpos de unión a CD20 se pueden administrar solos o junto con un segundo agente terapéutico tal como un segundo anticuerpo, o un agente quimioterapéutico, o un agente inmunosupresor. El segundo anticuerpo puede ser uno que se una a CD20 o a un antígeno de células B diferente, o un NK o un antígeno de células T. En una realización, el segundo anticuerpo es un anticuerpo dirigido contra CD20 radiomarcado. En otras realizaciones, el anticuerpo de unión a CD20 está conjugado con un agente citotóxico que incluye una toxina o un isótopo radioactivo.

60 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria seleccionada entre el grupo que consiste en dermatomiositis, granulomatosis de Wegener, ANCA, anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), deficiencia en factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, rechazo al trasplante de órgano sólido, enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), mediada por IgM, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), tiroiditis de Hashimoto, hepatitis autoinmunitaria, 65 neumonitis intersticial linfocítica (VIH), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-

Barre, vasculitis de grandes vasos, arteritis de células gigantes (de Takayasu), vasculitis de vasos intermedios, enfermedad de Kawasaki, poliarteritis nodosa, que comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de unión a CD20. En una realización de este método, el anticuerpo de unión a CD20 es Rituxan®.

5 Se describe en el presente documento un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO.:24 de CD20 de macaco (mostrada en la Fig. 19). Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido con las sustituciones de aminoácidos conservativas mostradas en la Fig. 20. Un vector puede comprender el ácido nucleico anterior, incluyendo un vector de expresión para su expresión en una
10 célula hospedadora. Una célula hospedadora puede comprender el vector. También se describe un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la [SEQ ID NO.25; Fig. 20] de CD20 de macaco.

Breve descripción de las figuras

15 La Fig. 1A es una alineación de secuencias que compara las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (V_L) de cada uno de 2H7 murino (SEQ ID NO. 1), variante 2H7.v16 humanizada (SEQ ID NO. 2), y subgrupo I de la cadena ligera kappa humana (SEQ ID NO. 3). Las CDR de 2H7 de V_L y de hu2H7.v16 son como sigue: CDR1 (SEQ ID NO.4), CDR2 (SEQ ID NO.5), y CDR3 (SEQ ID NO.6).

20 La Fig. 1B es una alineación de secuencias que compara las secuencias V_H de 2H7 murino (SEQ ID NO. 7), variante 2H7.v16 humanizada (SEQ ID NO. 8), y la secuencia de consenso del subgrupo III de la cadena pesada humana (SEQ ID NO. 9). Las CDR de V_H de 2H7 y hu2H7.v16 son como sigue: CDR1 (SEQ ID NO.10), CDR2 (SEQ ID NO. 11), y CDR3 (SEQ ID NO.12).

25 En la Fig. 1A y en la Fig. 1B, la CDR1, CDR2 y CDR3 de cada cadena están incluidas entre corchetes, flanqueadas por las regiones marco, FR1-FR4, como se indica. 2H7 se refiere al anticuerpo murino 2H7. Los asteriscos entre dos filas de secuencias indican las posiciones de las secuencias que son diferentes entre las dos secuencias. La numeración de restos se realiza según Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), con las inserciones mostradas como a, b, c, d, y e.

30 La Fig. 2 muestra la secuencia del fagémido pVX4 (SEQ ID NO. 13) usada para la construcción de plásmidos Fab de 2H7 (véase el Ejemplo 1) así como las secuencias de aminoácidos de la cadena L (SEQ ID NO. 14) y de la cadena H (SEQ ID NO.15) del Fab del anticuerpo humanizado dirigido contra IFN- α injertado con CDR.

La Fig. 3 muestra la secuencia del plásmido de expresión que codifica el Fab de 2H7.v6.8 quimérico (SEQ ID NO.16). Se muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena L (SEQ ID NO.17) y la cadena H (SEQ ID NO.18).

35 La Fig. 4 muestra la secuencia del plásmido pDR1 (SEQ ID NO.19; 5391 pb) para la expresión de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina como se describe en el Ejemplo 1. pDR1 contiene secuencias que codifican un anticuerpo irrelevante, la cadena ligera de un anticuerpo humanizado dirigido contra CD3 (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)), cuyos codones de inicio y de terminación están indicados en negrita y subrayado.

40 La Fig. 5 muestra la secuencia del plásmido pDR2 (SEQ ID NO.20; 6135 pb) para la expresión de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina como se describe en el Ejemplo 1. pDR2 contiene secuencias que codifican un anticuerpo irrelevante, la cadena pesada de un anticuerpo humanizado dirigido contra CD3 (Shalaby et al., *supra*), cuyos codones de inicio y de terminación están indicados en negrita y subrayado.

45 La Fig. 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena L completa de 2H7.v16 (SEQ ID NO.21). Los primeros 19 aminoácidos antes de DIQ son la secuencia de señal secretora que no está presente en la cadena polipeptídica maduras.

La Fig. 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena L completa de 2H7.v16 (SEQ ID NO.22). Los primeros 19 aminoácidos antes de EVQ son la secuencia de señal secretora que no está presente en la cadena polipeptídica maduras. Alineando la secuencia V_H de la Fig. 1B (SEQ ID NO. 8) con la secuencia de la cadena H completa, la región constante $\gamma 1$ humana va desde la posición de aminoácido 114-471 de la SEQ ID NO. 22.

50 La Fig. 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena L completa de 2H7.v31 (SEQ ID NO.23). Los primeros 19 aminoácidos antes de EVQ son la secuencia de señal secretora que no está presente en la cadena polipeptídica maduras. La cadena L es la misma que para 2H7.v16 (véase la Fig. 6).

La Fig. 9 muestra la estabilidad relativa de las variantes de IgG 2H7.v16 y 2H7.v73. Los resultados de los ensayos se normalizaron a los valores anteriores a la incubación y se notificaron como el porcentaje remanente después de la incubación.

55 La Fig. 10 es una diagrama de flujo que resume los cambios en los aminoácidos entre el 2H7 murino hasta un subconjunto de versiones humanizadas para llegar a v75.

La Fig. 11 es un resumen del recuento promedio absoluto de células B [CD3-/CD40+] en todos los grupos (estudio 2H7 y estudio Rituxan combinados), tal como se describe en el Ejemplo 10.

60 La Fig. 12 muestra los resultados de un ensayo ADCC representativo de variantes de 2H7 deficientes en fucosa, como se describe en el Ejemplo 11.

La Fig. 13 muestra los resultados de una tinción con Anexina V representada gráficamente en función de la concentración del anticuerpo. Las células Ramos se trataron con un anticuerpo de control IgG 1 irrelevante (Herceptin®; círculos), Rituximab (cuadrados), o rhuMAB 2H7.v16 (triángulos) en presencia de un anticuerpo secundario de reticulación, y se analizaron mediante FACS. Las Figuras 13-15 se describen en el Ejemplo 13.

65 La Fig. 14 muestra los resultados de una tinción doble con Anexina V y yoduro de propidio representada

gráficamente en función de la concentración del anticuerpo. Las células Ramos se trataron con un anticuerpo de control IgG1 irrelevante (Herceptin®; círculos), Rituximab (cuadrados), o rhuMAB 2H7.v16 (triángulos) en presencia de un anticuerpo secundario de reticulación, y se analizaron mediante FACS.

La Fig. 15 muestra el recuento (en 10 s) de células vivas, las células no teñidas se representaron gráficamente en función de la concentración del anticuerpo. Las células Ramos se trataron con un anticuerpo de control IgG1 irrelevante (Herceptin®; círculos), Rituximab (cuadrados), o rhuMAB 2H7.v16 (triángulos) en presencia de un anticuerpo secundario de reticulación, y se analizaron mediante FACS.

Las Figuras 16, 17, 18 muestran la inhibición del crecimiento de células tumorales Raji en ratones atímicos, tal como se describe en el Ejemplo 14. Los animales se trataron semanalmente (como se indica mediante flechas verticales; n=8 ratones por grupo) durante 6 semanas con PBS (control) o con Rituxan® o rhuMAB 2H7.v16 a 5 mg/kg (FIG. 16), 0,5 mg/kg (Fig. 17), o 0,05 mg/kg (Fig. 18).

La Fig. 19 muestra las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO.14) y aminoácidos (SEQ ID NO.15) de CD20 de macaco, tal como se describe en el Ejemplo 15.

La Fig. 20 muestra la secuencia de aminoácidos de CD20 de macaco. Los restos que se diferencian del CD20 humano están subrayados y los restos humanos se indican directamente bajo el resto de mono. El posible dominio extracelular de CD20 de mono está en negrita.

La Fig. 21 muestra los resultados de células de macaco que expresan la unión de CD20 a hu2H7.v16, .v31, y Rituxan, tal como se describe en el Ejemplo 15. Los anticuerpos se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para unirse y desplazar la unión del 2H7 de murino conjugado con FITC a CD20 de cinomolgo.

La Fig. 22 muestra el esquema de escalado de dosis para el ensayo clínico en fase I/II de artritis reumatoide.

La Fig. 23 muestra el vector para la expresión de 2H7.v16 en células CHO.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

El antígeno "CD20" es una fosfoproteína transmembrana glicosilada con un peso molecular de aproximadamente 35 kD que se encuentra en la superficie de más del 90 % de las células B de la sangre periférica u órganos linfoides. CD20 se expresa en las primeras etapas del desarrollo de las precélulas B, y permanece hasta la diferenciación de las células en el plasma; no se encuentra en los citoblastos humanos, células precursoras linfoides o en células plasmáticas normales. CD20 está presente tanto en las células B normales como en las células B malignas. En la bibliografía, otros nombres de CD20 incluyen "antígeno de diferenciación restringido de linfocitos B" y "Bp35". En antígeno CD20 se describe en, por ejemplo, Clark y Ledbetter, Adv. Can. Res. 52:81-149 (1989) y Valentine et al. J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287 (1989).

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (que incluyen los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad o función biológica deseada.

La actividad biológica de los anticuerpos de unión a CD20 y de unión a CD20 humanizado de la presente invención incluirán al menos la unión del anticuerpo al CD20 humano, más preferentemente la unión al CD20 humano y de otros primates (incluidos el macaco, mono rhesus, y chimpancé). Los anticuerpos se unirán a CD20 con un valor de K_d no superior a 1×10^{-8} , preferentemente un valor de K_d no superior a aproximadamente 1×10^{-9} , y será capaz de destruir o agotar las células B in vivo, preferentemente en al menos un 20 % cuando se compara con el correspondiente control negativo que no está tratado con dicho anticuerpo. El agotamiento de células B puede ser el resultado de uno o más de ADCC, CDC, apoptosis, u otro mecanismo. En algunas realizaciones del tratamiento de las enfermedades del presente documento, se pueden desear funciones efectoras o mecanismos específicos y no otros, y algunas variantes del 2H7 humanizado se prefieren para conseguir dichas funciones biológicas, tales como ADCC.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión a antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena ligera y de cadena pesada en asociación estrecha no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles en cada una de las cadenas H y L) que aportan los restos de aminoácidos para la unión al antígeno y que transmiten al anticuerpo la especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy

específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales) que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y esto no se debe de tomar como una necesidad de preparar el anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez en Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos contra fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los "fragmentos funcionales" de los anticuerpos de unión a CD20 de la invención son aquellos fragmentos que retienen la unión al CD20 con prácticamente la misma afinidad que la molécula intacta de longitud completa de la que se derivan, y muestran actividad biológica incluyendo el agotamiento de células B tal como se determina mediante ensayos in vitro o in vivo tales como los descritos en el presente documento.

El término "variable" se refiere al hecho de que algunos segmentos de los dominios variables tienen secuencias que varían ampliamente entre los anticuerpos. El dominio V media en la unión al antígeno, y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a través de los 110 aminoácidos que constituyen los dominios variables. En su lugar, las regiones V consisten en variantes relativamente ajustados que se denominan regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables", cada una con 9-12 aminoácidos de longitud. Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprende cuatro regiones FR, que en gran medida adoptan una configuración de β -lámina, unidas entre sí por medio de tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y, en algunos casos forman parte de, la estructura de la β -lámina. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las FR y, junto con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende, de forma general, los restos de aminoácido de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la V_L , y aproximadamente alrededor de 31-35B (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en la V_H (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos restos procedentes de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) de la V_L , y 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) de la V_H (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

Como se hace referencia en el presente documento, la "secuencia consenso" o secuencia consenso del dominio V es una secuencia artificial derivada de la comparación entre secuencias de aminoácidos de secuencias conocidas de la región variable de la inmunoglobulina humana. Basándose en estas comparaciones, se prepararon secuencias de ácidos nucleicos recombinantes que codifican los aminoácidos del dominio V que son un consenso de las secuencias derivadas a partir de los dominios V K humano y del subgrupo III de la cadena H humana. La secuencia V de consenso no tienen ninguna especificidad o afinidad de unión a antígeno conocida.

Los anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricas" tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo concreta, mientras que la cadena (o las cadenas) restante es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Un anticuerpo humanizado, tal como se usa en el presente documento es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una mínima parte de la secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o aceptor) en las que los restos de la región hipervariable del receptor están sustituidos por restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, rata, conejo o un primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones

se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de la inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoren la afinidad de unión. El número de estas sustituciones de aminoácidos en la FR no suele ser mayor de 6 en la cadena H y, en la cadena L, de no más de 3. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera opcional al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struck. Biol.* 2:593-596 (1992).

Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por defecto de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que una Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta un antígeno y eliminar posteriormente la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha eliminación. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un ensayo ADCC *in vitro*, tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa o adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una secuencia de FcR humano natural. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores de FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Véase la revisión M. en Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se han revisado en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo aquellos que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG de la madre al feto (Guyer et al, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase, además, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y llevan a cabo funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo una función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase adecuada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de la región Fc alterada y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.194.551 B1, y en el documento WO99/51642. Véase, además, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

El sitio de N-glicosilación en IgG se encuentra en Asn297 del dominio CH2. La presente invención proporciona

también composiciones de un anticuerpo humanizado de unión a CD20 que tiene una región Fc, en la que aproximadamente un 80-100 % (y preferentemente aproximadamente un 90-99 %) del anticuerpo de la composición comprende una estructura madura de núcleo de carbohidrato que carece de fucosa, unida a la región Fc de la glicoproteína. Se demuestra en el presente documento que dichas composiciones presentan una mejora sorprendente en la unión a FcγRIIIA(F158), que no es tan eficaz como FcγRIIIA (V158) para interactuar con la IgG humana. Por lo tanto, se anticipa que las composiciones del presente documento son superiores a las composición de anticuerpo dirigido contra CD20 anteriormente descritas, especialmente para el tratamiento de pacientes humanos que expresan FcγRIIIA (F158). FcγRIIIA (F158) es más habitual que FcγRIIIA (V158) en sujetos afroamericanos y caucásicos sanos normales. Véase Lehmbacher et al. Blood 94:4220 (1999). La presente solicitud demuestra además el aumento sinérgico en la unión de FcγRIII y/o en la función ADCC que es resultado de combinar las variaciones de glicosilación del presente documento con la una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la región Fc de la glicoproteína.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que pueden interferir con usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y puede incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más de del 95 % en peso de anticuerpo, según se determina mediante el método de Lowry, y lo más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos en el extremo N o la secuencia interna de aminoácidos mediante el uso de un secuenciador de copa rotatoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. De forma habitual, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada se encuentra en una forma o configuración distinta a la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan normalmente el anticuerpo en donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica distinta de la de las células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refieren a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida de manera operativa a un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se pone en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder de secreción está operativamente unido al ADN de un polipéptido si se expresa en forma de una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operablemente unido a una secuencia de codificación si altera la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si está colocado de manera que facilite la traducción. En general, "operablemente unido" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y que, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se realiza mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica habitual.

"Vector" incluye vectores lanzadera y vectores de expresión. Normalmente, la construcción de plásmido incluirá también un origen de replicación (por ejemplo, el origen de replicación ColE1) y un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a ampicilina o tetraciclina), para replicación y selección, respectivamente, de los plásmidos en la bacteria. Un "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene las secuencias de control o los elementos de regulación necesarios para la expresión de los anticuerpos incluyendo los fragmento de anticuerpos de la invención, en células bacterianas o eucariotas. Los vectores adecuados se describen más adelante.

La célula que produce un anticuerpo de unión a CD20 humanizado de la invención incluirá las células hospedadoras bacterianas y eucariotas en las que se ha introducir el ácido nucleico que codifica los anticuerpos. Las células hospedadoras adecuadas se divulgan a continuación.

El término "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugada directamente o indirectamente con el anticuerpo. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química del compuesto o composición sustrato que es detectable.

En el presente documento, una "enfermedad autoinmunitaria" es una enfermedad o trastorno no neoplásico que surge a partir de y se dirige contra los antígenos y/o tejidos propios (auto).

Tal como se usa en el presente documento, "agotamiento de células B" se refiere a una reducción en los niveles de células B en un animal o ser humano después del tratamiento con el fármaco o el anticuerpo, en comparación con el nivel de células B antes del tratamiento. Los niveles de células B se pueden medir usando ensayos bien conocidos como los que se describen en los Ejemplos experimentales. El agotamiento de células B puede ser total o parcial. En una realización, el agotamiento de células B que expresan CD20 es al menos un 25 %. Sin limitarse a ningún mecanismo concreto, los posibles mecanismos para el agotamiento de células B incluyen ADCC, CDC, apoptosis, modulación del flujo de calcio o una combinación de dos o más de los anteriores.

La expresión "agente citotóxico" cuando se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes o alcalinizantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelamina incluyendo altretamina, t-etilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clomopazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalano, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliceamicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (adriamicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcellomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); ácido fólico y análogos tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; recuperadores de ácido fólico tales como el ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxidurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirán; espirogermanio, ácido tenuazonico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotriemilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinblastina; vinorelbina; navelbina; novantrona; nitipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores tales como antiestrógenos como por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromataza, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); antandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; otros agentes quimioterapéuticos como la prednisolona. Están incluidas las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los anteriores.

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere a un tratamiento tanto terapéutico o profiláctico como a medidas preventivas, cuyo objeto es prevenir o ralentizar (atenuar) la afección o trastorno patológico diana. Un sujeto se "trata" satisfactoriamente para un cáncer o enfermedad autoinmunitaria positivo para CD20 si, tras recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo de unión a CD20 de la invención de acuerdo con los métodos de la presente invención, el sujeto muestra una reducción observable y/o medible en o la ausencia de uno o más signos y síntomas de la enfermedad particular. Por ejemplo, para el cáncer, una reducción en el número de células cancerosas o la ausencia de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; la inhibición (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) de la metástasis tumoral; la inhibición, hasta cierto punto, del crecimiento tumoral; aumento de la duración de la remisión, y/o alivio en cierta medida, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; reducción de la morbilidad y mortalidad, y mejora en la calidad de vida. La reducción en los signos o síntomas de una enfermedad también pueden percibirse por el paciente. El tratamiento puede lograr una respuesta completa, definida como la desaparición de todos los signos de cáncer, o bien una respuesta parcial, en la que se reduce el tamaño del tumor, preferentemente en más de un 50 por ciento, más preferentemente en un 75 %. También se considera a un paciente como tratado si el paciente experimenta una enfermedad estable. En una realización preferida, los pacientes de cáncer se mantienen sin progresión en el cáncer después de un año,

preferentemente después de 15 meses. Estos parámetros para evaluar un tratamiento exitoso y una mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos rutinarios familiares para un médico experto en la materia.

- 5 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo o fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhiben, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición anterior proporcionada para "tratar".

- 15 La administración "crónica" se refiere a la administración de uno o más agentes de una manera continua, a diferencia de un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico (actividad) inicial durante un periodo de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es un tratamiento que no se efectúa consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

Composiciones y métodos de la invención

- 20 La invención proporciona anticuerpos humanizados como se muestra en las reivindicaciones. Un anticuerpo descrito en el presente documento puede tener una cadena H que tiene al menos una, preferentemente dos o todas las CDR de la cadena H de un anticuerpo de una especie no humana dirigido contra CD20 humana (anticuerpo donante) y sustancialmente todos los restos del marco de un anticuerpo de consenso humano como el anticuerpo receptor. El anticuerpo donante puede proceder de varias especies no humanas incluyendo ratón, rata, cobaya, cabra, un conejo, caballo, primate, pero de forma más frecuente será un anticuerpo de murino. "Sustancialmente todo" en este contexto significa que las regiones FR del receptor en el anticuerpo humanizado pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos no originalmente presentes en la secuencia FR de consenso humana. Estos cambios de FR pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o el anticuerpo donante.

- 30 El anticuerpo donante puede ser el anticuerpo 2H7 de murino, incluyendo la región V las secuencias de CDR y de FR de cada una de las cadenas H y L que se muestran en las Figs. 1A y 1B. Los restos del marco Fab humano corresponden a la secuencia consenso del subgrupo I de V_K y del subgrupo III de V_H humanas, estas secuencias de consenso se muestran en la Figura 1A y la Figura 1B, respectivamente. El anticuerpo 2H7 humanizado puede tener al menos una de las CDR en la cadena H del anticuerpo donante de murino. El anticuerpo 2H7 humanizado que se une a CD20 humano puede comprender las CDR de las cadenas H y L del anticuerpo donante.

- 40 En un anticuerpo de longitud completa, el anticuerpo de unión a CD20 humanizado de la invención comprenderá un dominio V humanizado unido a un dominio C de una inmunoglobulina humana. En una realización preferida, la región C de la cadena H es de IgG humana, preferentemente IgG1 o IgG3. El dominio C de la cadena L es preferentemente de la cadena κ humana.

- 45 Salvo que se indique otra cosa, en el presente documento, una versión del anticuerpo 2H7 humanizado tendrá las secuencias del dominio V y el dominio C de la cadena L de 2H7.v16 (Fig. 6, SEQ ID NO. 21) y la cadena H (Fig. 7, SEQ ID NO. 22) excepto en las posiciones de las sustituciones o cambios de aminoácidos indicadas en los ejemplos experimentales siguientes.

- 50 Los anticuerpos de unión a CD20 humanizados se unirán al menos al CD20 humano y se unirán a otros CD20 de primate tal como de monos que incluyen al macaco y a los monos rhesus, y a los chimpancés. Se divulga la secuencia del CD20 de macaco en el Ejemplo 15 y la Figura 19.

- 55 La actividad biológica de los anticuerpos de unión a CD20 y de unión a CD20 humanizado de la presente invención incluirán al menos la unión del anticuerpo al CD20 humano, más preferentemente la unión al CD20 humano y de primate (incluidos el macaco, mono rhesus, chimpancés), con un valor K_d no mayor de 1×10^{-8} , preferentemente con un valor K_d no mayor de aproximadamente 1×10^{-9} , incluso de forma más preferente a un valor K_d no mayor de aproximadamente 1×10^{-10} , y capaz de eliminar o agotar las células B in vitro o in vivo, preferentemente en al menos un 20 % cuando se compara con el correspondiente nivel inicial o control negativo que no está tratado con dicho anticuerpo.

- 60 El nivel deseado de agotamiento de las células B dependerá de la enfermedad. Para el tratamiento de un cáncer positivo para CD20, puede ser deseable maximizar el agotamiento de células B que son la diana de los anticuerpos dirigidos contra CD20 de la invención. Por lo tanto, para el tratamiento de una neoplasia de células B positiva para CD20, es deseable que el agotamiento de las células B sea suficiente para evitar al menos la progresión de la enfermedad que puede ser evaluada por el médico experto en la materia, por ejemplo, vigilando el crecimiento tumoral (tamaño), la proliferación del tipo de células cancerosas, metástasis, otros signos y síntomas del cáncer concreto. Preferentemente, el agotamiento de las células B es suficiente para evitar la progresión de la enfermedad durante al menos 2 meses, más preferentemente 3 meses, incluso más preferentemente 4 meses, más

preferentemente 5 meses, incluso más preferentemente 6 o más meses. En realizaciones aún más preferidas, el agotamiento de las células B es suficiente para aumentar el tiempo de remisión durante al menos 6 meses, más preferentemente 9 meses, más preferentemente un año, más preferentemente 2 años, más preferentemente 3 años, aún más preferentemente 5 años o más. En la realización más preferida, el agotamiento de las células B es suficiente para curar la enfermedad. En realizaciones preferidas, el agotamiento de las células B en un paciente con cáncer es al menos aproximadamente del 75 % y más preferentemente, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % e incluso 100 % del nivel valor inicial antes del tratamiento.

Para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, puede ser deseable modular la extensión del agotamiento de células B dependiendo de la enfermedad y/o de la gravedad de la dolencia en el paciente individual, ajustando la dosificación del anticuerpo de unión a CD20. Por lo tanto, el agotamiento de las células B puede, pero no tiene porqué ser completo. O bien, puede desearse el agotamiento total de células B en el tratamiento inicial, pero en tratamientos posteriores, la dosificación puede ajustarse para conseguir solo un agotamiento parcial. En una realización, el agotamiento de las células B es al menos del 20 %, es decir, permanece un 80 % o menos de células B positivas para CD20, en comparación con el valor inicial antes del tratamiento. En otras realizaciones, el agotamiento de células B es del 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o mayor. Preferentemente, el agotamiento de las células B es suficiente para detener la progresión de la enfermedad, más preferentemente para aliviar los signos y síntomas de la enfermedad concreta bajo tratamiento, incluso más preferentemente para curar la enfermedad.

Los anticuerpos de unión a CD20 biespecíficos son anticuerpos en los que un brazo del anticuerpo tiene una cadena H y una cadena L humanizada del anticuerpo de unión a CD20 humanizado de la invención, y el otro brazo tiene especificidad de unión a la región V de un segundo antígeno. El segundo antígeno puede seleccionarse entre el grupo que consiste en CD3, CD64, CD32A, CD16, NKG2D u otros ligandos de activación de NK.

En comparación con Rituxan (rituximab), v16 presenta aproximadamente una potencia de ADCC aumentada de 2 a 5 veces, una CDC disminuida ~3-4 veces con respecto a Rituxan.

Producción de anticuerpos

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente para estimular a los linfocitos a que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Tras la inmunización, los linfocitos se aíslan y a continuación se fusionan con una línea de células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta forma se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas (denominadas también ligandos). Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma que actúan como ligandos preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio selectivo que elimina por selección las células precursoras no fusionadas. Las líneas de células de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores MOPC-21 y MPC-11 de ratón disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU., y SP-2 y los derivados, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE.UU. Se han descrito también líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-ser humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que están creciendo las células de hibridoma se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard

descrito en Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

- Una vez que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad deseada, afinidad, y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse limitando los procedimientos de dilución y crecen mediante métodos normalizados (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPMI-1640. Además, se pueden hacer crecer células de hibridoma no humano *in vivo* como tumores de ascites en un animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. de las células en ratones.
- Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido de ascites o del suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, utilizando proteína A o proteína G-Sefarosa) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.
- El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfecta en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión acerca de la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen, Skerra et al., Curr. Opin. in Immunol., 5:256-262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).
- En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.
- El ADN que codifica el anticuerpo puede modificarse para producir polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de anticuerpos de fusión, por ejemplo, sustituyendo las secuencias del dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera humanas (C_H y C_L) por las secuencias homólogas de murino (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y en Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), o fusionando la secuencia de codificación de la inmunoglobulina con todo o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido no de inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias del polipéptido no de inmunoglobulina pueden sustituir los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

45 *Anticuerpos humanizados*

Se han descrito en la técnica los métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "donante". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La selección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a utilizar en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo humano contra Ig de ratón) cuando se pretende el anticuerpo para uso terapéutico humano. De acuerdo con el método llamado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se reconoce frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. Se identifica la secuencia del dominio V humano que sea más próxima a la del roedor, y la región marco (FR) humana de esta se acepta para el anticuerpo humanizado (Sims et

al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro método usa una región marco conservada particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse el mismo marco conservado para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad de unión al antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Están comúnmente disponibles modelos de tridimensionales de inmunoglobulinas y son familiares para los expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras tridimensionales conformacionales probables de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que afectan a la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el uno o más antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están directa y muy sustancialmente involucrados en alterar la unión al antígeno.

El anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

25 *Anticuerpos humanos y metodología de expresión en fagos*

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es ahora posible producir animales transgénicos no humanos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, *por ejemplo*, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); las patentes de Estados Unidos con números 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y el documento WO 97/17852.

Como alternativa, se puede usar la tecnología de expresión en fagos (McCafferty et al., Nature 348:552-553 [1990]) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de la inmunoglobulina procedentes de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco tanto en un gen de la proteína de revestimiento mayor como en un gen de la proteína de revestimiento menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Como la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan como resultado también la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta dichas propiedades. Por lo tanto, el fago imita alguna de las propiedades de las células B. Se puede llevar a cabo la expresión en el fago en varios formatos, revisados en, *por ejemplo*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en el fago. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria poco aleatorizada de genes V derivados de bazo de ratones humanizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos inmunizados y anticuerpos para que se pueda aislar una matriz diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Véanse, también las patentes de Estados Unidos con números 5.565.332 y 5.573.905.

Tal como se ha discutido anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vitro* (véanse las patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

60 *Fragmentos de anticuerpo*

En determinados casos hay ventajas en cuanto al uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una rápida eliminación, y puede conducir a accesos mejorados de tumores sólidos.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, hoy en día esos fragmentos pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de las fagotecas de anticuerpos discutidas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente a partir de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* aumentada que comprenden restos de epítipo de unión a receptor salvajes se describen en la patente de Estados Unidos 5.869.046. Serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de los Estados Unidos n.º 5.571.894; y la patente de los Estados Unidos n.º 5.587.458. Fv y sFv son los únicos tipos con sitios de combinación intacto que están desprovistos de regiones constantes; así, son adecuados para una unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o en el extremo carboxilo terminal de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, anteriormente citado. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína CD20. Otros anticuerpos de ese tipo pueden combinar un sitio de unión a CD20 con un sitio de unión para otra proteína. Como alternativa, se puede combinar un brazo del anticuerpo dirigido contra CD20 con un brazo que se une a una molécula estimuladora en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD3) o receptores de Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16), o NKG2D u otro ligando de activación de los linfocitos NK, con el fin de centrar y localizar los mecanismos de defensa celular para las células que expresan CD20. Se pueden utilizar también anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan CD20. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a CD20 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti interferón α, alcaloides de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o el isótopo radioactivo de hapteno). Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, F(ab')₂ biespecíficos).

El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico dirigido contra ErbB2 y dirigido contra FcγRI 11 y la patente de Estados Unidos n.º 5.837.234 divulga un anticuerpo dirigido contra ErbB2 y dirigido contra FcγRI. Se muestra en el documento WO98/02463 un anticuerpo biespecífico dirigido contra ErbB2/Fcα. La patente de Estados Unidos n.º 5.821.337 ensaña un anticuerpo biespecífico dirigido contra ErbB2 y dirigido contra CD3.

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión simultánea de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y col., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se efectúa normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y el rendimiento de producto es bajo. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de la bisagra, las regiones C_H2 y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan simultáneamente a una célula hospedadora adecuada. Esto proporciona mayor flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usados en la construcción proporciona el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no afectan significativamente el rendimiento de la cadena deseada.

En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de la inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.731.168, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). En la interfase de la segunda molécula de anticuerpo se crean "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico al de la una o más cadenas laterales mediante la sustitución de largas cadenas laterales de aminoácido por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de Estados Unidos n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los anticuerpos reticulantes adecuados son bien conocidos en la técnica, y se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar los ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH procedentes de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de F(ab')₂ de cuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado desde *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera pudo unirse a células que expresaban en exceso el receptor de ErbB2 y las células T humanas normales, así como de estimular la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos frente a dianas de tumores de mama humanos.

También se han descrito varias técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" se describe por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. En consecuencia, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha comunicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros monocatenarios de Fv (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una

célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos a los de clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno en posición aminoterminal respecto de la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en el que las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región de la cadena Fc; o VH-CH1-VH-CH1-región de la cadena Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento comprende además preferentemente al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio C_L.

Otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos

Se contemplan una o varias en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de unión a CD20 descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o el resto de propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo dirigido contra CD20 se preparan introduciendo los cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo dirigido contra CD20, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo dirigido contra CD20. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos pueden alterar también los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo dirigido contra CD20, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para identificar determinados restos o regiones del anticuerpo dirigido contra CD20 que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" tal como se describe en Cunningham y Wells en Science, 244:1081-1085 (1989). En el presente documento, se identifican un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferentemente alanina o polialanina) que afecta la interacción entre los aminoácidos y el antígeno CD20. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos esté predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se llevó a cabo el barrido de ala o la mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de anticuerpos dirigidos contra CD20 expresadas se seleccionan según la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino y/o carboxilo en el intervalo de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos simples o múltiples de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo dirigido contra CD20 con un resto metionilo en el extremo N o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo dirigido contra CD20 incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo dirigido contra CD20 con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o con un polipéptido que aumente la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula del anticuerpo dirigido contra CD20 sustituido por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero se contemplan también alteraciones de FR. En la siguiente Tabla siguiente se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir más cambios sustanciales, denominadas como "sustituciones ilustrativas" en la Tabla, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos y seleccionarse los productos.

65

TABLA de sustituciones de aminoácidos

Resto original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gin; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

5 Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del armazón polipeptídico en la zona de la sustitución, por ejemplo, en una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga de hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

- 10 (1) hidrófoba: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
 (2) hidrófila neutra: cys, ser, thr;
 (3) ácidas: asp, glu;
 (4) básica: asn, gln, his, lys, arg;
 (5) restos que alteran la orientación de cadena: gly, pro; y
 (6) aromática: trp, tyr, phe.

15 Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

20 Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada del anticuerpo dirigido contra CD20 puede sustituirse también, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación anómala. Por el contrario, se pueden añadir uno o más enlaces cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

25 Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). En general, la una o más variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad utilizando la expresión en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto génico III del M13 empaquetado en cada partícula. Las variantes expresadas en fagos se seleccionan a continuación según su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. A fin de identificar los sitios candidatos para la modificación de la región hipervariable, se puede llevar a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. De forma alternativa o adicional, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de

contacto entre el anticuerpo y el CD20 humano. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a selección como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

5 Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende eliminar uno o más restos de hidratos de carbono que se encuentran en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

10 La glucosilación de anticuerpos está por lo general unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La
15 glucosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

20 La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptido anteriormente descritas (por ejemplo, sitios de glucosilación unidos a N). La alteración puede realizarse también mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

25 Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo dirigido contra CD20 se preparan mediante varios métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), la mutagénesis de la PCR, y la mutagénesis de casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante del anticuerpo dirigido
30 contra CD20.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. De forma alternativa o adicional, pueden introducirse uno o varios restos cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación de células mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Se pueden preparar también anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada mediante el uso de reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede modificarse por ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y de este modo puede potenciarse la lisis del complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).
35 40

45 Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la patente de los Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la vida media en suero de la molécula de IgG *in vivo*.
50

Otras modificaciones en anticuerpos

Se contemplan en el presente documento otras modificaciones en anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede unir a uno de varios polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo puede estar atrapado también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, Oslo, A., Ed., (1980).
55 60

Cribado de anticuerpos con las propiedades deseadas

Se pueden seleccionar anticuerpos con determinadas características biológicas como se describe en los Ejemplos experimentales.
65

Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo dirigido contra CD20 de la invención pueden evaluarse mediante métodos conocidos en la materia, por ejemplo, utilizando células que expresan CD20 tanto de forma endógena como tras la transfección con el gen CD20. Por ejemplo, las líneas de células tumorales y las células transfectadas con CD20 pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD20 de la invención a diversas concentraciones durante unos pocos días (por ejemplo, 2-7) días y teñirse con cristal violeta o MTT o analizarse mediante algún otro ensayo colorimétrico. Otro método de medir la proliferación sería comparando la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo dirigido contra CD20 de la invención. Tras el tratamiento con el anticuerpo, las células se recogen y se cuantifica la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN en un contador de centelleo. Los controles positivos adecuados incluyen el tratamiento de una línea de células seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esta línea de células.

Para seleccionar los anticuerpos que inducen la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de la integridad de membrana como se indica mediante, *por ejemplo*, la captación de yoduro de propidio (IP), azul tripán o 7AAD con respecto al control. Se puede llevar a cabo un ensayo de captación de IP en ausencia del complemento y de células efectoras inmunitarias. Las células tumorales que expresan CD20 se incuban con el medio solo o el medio que contiene el anticuerpo monoclonal adecuado a *por ejemplo*, aproximadamente 10 µg/ml. Las células se incuban durante un periodo de 3 días. Después de cada tratamiento, las células se lavaron y se distribuyen en alícuotas en tubos de 12 x 75 terminados en un filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para eliminar aglomerados de células. A continuación los tubos reciben IP (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar utilizando el citómetro de flujo FACSCAN™ y el programa informático FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Dichos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular, como se determina por la captación de IP, pueden seleccionarse como anticuerpos inductores de muerte celular.

Para seleccionar los anticuerpos que se unen a un epítipo de CD20 unido a un anticuerpo de interés, se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este ensayo se puede usar para determinar si un anticuerpo de ensayo se une al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo dirigido contra CD20 de la invención. De forma alternativa o adicional, se puede llevar a cabo el cartografiado de epítipos mediante métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, se puede mutagenizar la secuencia del anticuerpo tal como mediante un barrido de alanina, para identificar restos de contacto. El anticuerpo mutante se ensaya inicialmente para determinar la unión con un anticuerpo policlonal para asegurar el plegado adecuado. En un método diferente, los péptidos que corresponden a diferentes regiones de CD20 se pueden usar en ensayos de competición con los anticuerpos de ensayo o un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

La invención proporciona también un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de unión a CD20 humanizado, vectores y células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico, y las técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para su clonación posterior (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de la secuencia señal

El anticuerpo de unión a CD20 de la presente invención puede producirse de forma recombinante no solo de forma directa, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es aquella que se reconoce y procesa (es decir, se escinde mediante una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariontas que no reconocen y procesan la secuencia señal del anticuerpo de unión a CD20 natural, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o líderes de la enterotoxina II estable al calor. Para secreción en levaduras, la secuencia de señal nativa puede sustituirse por, *por ejemplo*, el líder de la invertasa de levadura, el líder de factor α (incluyendo los líderes del factor α *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, están disponibles las secuencias señal de mamífero, así como los líderes de secreción víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

El ADN de dicha región precursora está ligado en un marco de lectura con el ADN que codifica el anticuerpo de

unión a CD20.

(ii) Origen de replicación

5 Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican autónomamente. Dichas secuencias son bien conocidas para varias bacterias, levaduras, y virus. El origen de replicación para el plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para las levaduras, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el origen del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión en mamífero (el origen de SV40 puede utilizarse de forma típica solamente por que contiene el promotor temprano).

15 (iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) transmiten resistencia a antibióticos u otras toxinas, *por ejemplo*, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias auxotróficas del complemento, o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, *por ejemplo*, el gen que codifica la D-alanina racemasa de *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere transmite al fármaco y que por tanto sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para las células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para capturar el ácido nucleico del anticuerpo de unión a CD20, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente los genes de la metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora adecuada cuando se emplea DHFR natural es la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente los hospedadores naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o transformadas simultáneamente con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo de unión a CD20, la proteína DHFR natural, y otro marcador de selección tal como la aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) se puede seleccionar mediante crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. véase la patente de Estados Unidos n.º 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85:12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un ambiente eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las células de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, se pueden usar vectores derivados del plásmido circular pKD1 de 1,6 μ m para la transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Como alternativa, se comunicó un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990). Se han divulgado también vectores de expresión multicopia estables para la secreción de albúmina madura de suero humano recombinante por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991).

(iv) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen normalmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica el anticuerpo de unión a CD20. Los promotores adecuados para el uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor the *phoA*, los sistemas promotores de la β -lactamasa y la lactosa, el promotor de la fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor de *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para el uso en sistemas bacterianos contendrán también una secuencia

Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo de unión a CD20.

Se conocen secuencias promotoras de eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a 25-30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada a 70 a 80 bases en dirección 5' del inicio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli-A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión de eucariotas.

10 Los ejemplos de secuencias promotoras de eucariotas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

15 Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotienina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y las enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en expresión en levadura se describen además en el documento EP 73.657. También se usan de manera ventajosa potenciadores de levadura junto con promotores de levadura.

25 La transcripción del anticuerpo de unión a CD20 a partir de vectores en células hospedadoras de mamíferos se controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de genomas de virus tales como el virus del polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferible el virus 40 de simio (SV40), procedentes de promotores heterólogos de mamíferos, *por ejemplo*, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula hospedadora.

30 Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción del SV40 que contiene también el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII. En la patente de Estados Unidos n.º 4.419.446 se divulga un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como vector. En la patente de Estados Unidos n.º 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. Véase también Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) acerca de la expresión del ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de la timidina quinasa procedente del virus del herpes simple. Como alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

40 (v) *Componente del elemento potenciador*

La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de unión a CD20 de la presente invención por eucariotas superiores aumenta a menudo insertando una secuencia potenciadora en el vector. Actualmente se conocen muchas secuencias potenciadoras procedentes de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador procedente de un virus de una célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado posterior del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado posterior del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) acerca de los elementos potenciadores para la activación de los promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en la posición 5' o 3' de la secuencia de codificación del anticuerpo de unión a CD20, pero se localiza preferentemente en un sitio en dirección 5' a partir del promotor.

(vi) *Componente de terminación de la transcripción*

55 Los vectores de expresión utilizados en células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están normalmente disponibles a partir de las regiones 5' y, en ocasiones 3', no traducidas de los ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo de unión a CD20. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión divulgado en el anterior.

(vii) *Selección y transformación de células hospedadoras*

65 Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores del presente documento son las células procariontas, levaduras, o células de eucariotas superiores descritas anteriormente. Los

procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación preferido es *E. coli* *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) también son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Los anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, y las proteínas de fusión de anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando las funciones de glicosilación y efectora Fc no son necesarias, como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado muestra eficacia por sí mismo en la destrucción de la célula tumoral. Los anticuerpos de longitud completa tienen una semivida en circulación más larga. La producción en *E. coli* es más rápida y mayor eficiente en costes. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, el documento U.S. 5.648.237 (Carter et al.), el documento U.S. 5.789.199 (Joly et al.), y el documento U.S. 5.840.523 (Simmons et al.) que describe la región de inicio de la traducción (RIT) y las secuencias señal para la optimización de la expresión y la secreción. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, por ejemplo, columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo de manera similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos o levaduras filamentosos son hospedadores adecuados de clonación y expresión para vectores que codifican anticuerpos de unión a CD20. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadería común, es la más usada entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, otros numerosos géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de tipo *Kluyveromyces*, tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, hospedadores de *Tolypocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo de unión a CD20 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyxmori*. Están públicamente disponibles varias cepas víricas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori* y dichos virus pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, y tabaco también pueden usarse como hospedadores.

Sin embargo, ha sido mayor el interés en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea celular de riñón embrionario humano (células 293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón de canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; linfocitos FS4+; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transformaron con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción del anticuerpo de unión a CD20 y se cultivaron en medios nutrientes convencionales según fuera adecuado para inducir promotores, seleccionado los transformantes, o amplificando los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de células hospedadoras

Las células hospedadoras utilizadas para producir el anticuerpo de unión a CD20 de la presente invención se

pueden cultivar en varios medios. Medios comercialmente disponibles como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980), patentes de Estados Unidos números 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o la solicitud de patente de Estados Unidos 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco de GENTAMICINA™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente equivalente de energía. Cualquier otro suplemento necesario puede también introducirse en concentraciones adecuadas que serán conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las utilizadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para una persona normalmente experta en la técnica.

(ix) Purificación de anticuerpo

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretado directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los residuos en partículas, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares pueden retirarse mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasas, tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse anticuerpos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía por afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con frecuencia agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permite caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos de los que pueden lograrse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3 , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación por etanol, HPLC en fase reversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en hepatina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de cualquier (cualquiera) etapa(s) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a una cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, realizada preferentemente a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, sal a aproximadamente 0-0,25 M).

Conjugados de anticuerpos

El anticuerpo de unión puede estar conjugado a un agente citotóxico tal como una toxina o un isótopo radioactivo. En determinadas realizaciones, la toxina es calicamicina, un maitansinoide, una dolastatina, auristatina E y análogos o derivados de los mismos, son preferibles.

Los fármacos/toxinas preferidos incluyen agentes perjudiciales para el ADN, inhibidores de la polimerización o despolimerización de microtúbulos y antimetabolitos. Las clases preferidas de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, los inhibidores de enzimas tales como los inhibidores de la dihidrofolato reductasa, y los inhibidores de la timidilato sintasa, intercalantes de ADN, sustancias que escinden el ADN, inhibidores de topoisomerasa, la familia de fármacos de antraciclina, los fármacos de la vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, la familia de fármacos de pteridina, diinenos, las podofilotoxinas y los inductores de la diferenciación. Los miembros especialmente útiles de estas clases incluyen, por ejemplo, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptapurina, arabinósido de citosina, melfalano, leurosina, leurosideina, actinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, N-(5,5-diacetoxipentil)doxorrubicina, morfolino-doxorrubicina, 1-(2-coroetil)-1,2-

dimetanosulfonil hidrazida, N⁸-acetil espermidina, aminopterina, metopterina, esperamicina, mitomicina C, mitomicina A, actinomicina, bleomicina, carminomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina y derivados de podofilotoxina tales como etopósido o etopósido fosfato, vinblastina, vincristina, vindesina, taxol, taxotere, ácido retinoico, ácido butírico, N⁸-acetil espermidina, camptotecina, caliceamicina, brostatinas, cefalostatinas, ansamitocina, actosina, maitansinoides tales como DM-1, maitansina, maitansinol, N-desmetil-4.5-desepoximaitansinol, C-19-decloromaitansinol, C-20-hidroximaitansinol, C-20-demetoximaitansinol, C-9-SH maitansinol, C-14-alcoximetilmaitansinol, C-14-hidroxi o acetiloximetilmaitansinol, C-15-hidroxi/acetiloxi-maitansinol, C-15-metoximaitansinol, C-18-N-demetilmaitansinol y 4,5-deoximaitansinol, auriestatinas tales como auristatina E, M, PHE y PE; doloestatinas tales como doloestatina A, doloestatina B, doloestatina C, doloestatina D, doloestatina E (20-epi y 11-epi), doloestatina G, doloestatina H, doloestatina I, doloestatina 1, doloestatina 2, doloestatina 3, doloestatina 4, doloestatina 5, doloestatina 6, doloestatina 7, doloestatina 8, doloestatina 9, doloestatina 10, deo-doloestatina 10, doloestatina 11, doloestatina 12, doloestatina 13, doloestatina 14, doloestatina 15, doloestatina 16, doloestatina 17, y doloestatina 18; cefaloestatinas tales como cefaloestatina 1, cefalostatina 2, cefalostatina 3, cefalostatina 4, cefalostatina 5, cefalostatina 6, cefalostatina 7,25'-epi-cefalostatina 7, 20-epi-cefalostatina 7, cefalostatina 8, cefalostatina 9, cefalostatina 10, cefalostatina 11, cefalostatina 12, cefaloestatina 13, cefalostatina 14, cefalostatina 15, cefalostatina 16, cefalostatina 17, cefalostatina 18, y cefalostatina 19.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló en primer lugar del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de los Estados Unidos n. 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios producen también maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (patente de Estados Unidos 4.151.042). Se describen el maitansinol sintético y sus derivados y análogos, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos números 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

La maitansina y los maitansinoides se han conjugado con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Se divulgan inmunoconjugados que contienen maitansinoides y sus usos terapéuticos, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos números 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describen inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era muy citotóxico para células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide mediante un enlazador de disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno de líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu.

Existen muchos grupos de unión conocidos en la materia para preparar los conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los divulgados en la patente de Estados Unidos 5.208.020 o en la patente EP 0 425 235 B1, y en Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa o grupos lábiles a esterasa, tal como se divulgan en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter.

Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden preparar usando varios agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como -succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bioactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, se puede formar un enlace éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción se puede producir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

60 *Caliqueamicina*

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo de unión a CD20 conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas en el ADN bicatenario a concentraciones por debajo de picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, véanse las patentes de los Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que

pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman et al. Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode et al. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes estadounidenses de American Cyanamid anteriormente mencionadas). Otro fármaco antitumoral al que puede conjugarse el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por anticuerpo potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Isótopos radiactivos

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo muy radioactivo. Está disponible varios isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos dirigidos contra CD20 radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios de gammagrafía, por ejemplo ^{99m}Tc o ^{123}I , o un marcador de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN), (también conocida como obtención de imágenes de resonancia magnética, IRM), tal como de nuevo yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los marcadores radioactivos u otros marcadores puede incorporarse al conjugado según modos conocidos. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, fluor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como ^{99m}Tc o ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re y ^{111}In puede unirse mediante un resto de cisteína al péptido. Puede unirse itrio-90 a través de un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al., (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe detalladamente otros métodos.

Los conjugados del anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando varios agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bioactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricino como se describe en Vitetta y col., Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en medio ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador que contiene dimetilo o disulfuro (Chari y col. Cancer Research 52: 127-131 (1992); patente de Estados Unidos n.º 5.208.020).

Usos terapéuticos de los anticuerpos de unión a CD20

Los anticuerpos de unión a CD20 de la invención son útiles para tratar numerosas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas incluidas enfermedades autoinmunitarias y dolencias relacionadas, y cánceres positivos para CD20 que incluyen linfomas de células B y leucemias. Los citoblastos (precursores de células B) de la médula ósea carecen del antígeno CD20, lo que permite que las células B sanas se regeneren después del tratamiento y vuelvan a los niveles normales en varios meses.

Las enfermedades autoinmunitarias o los trastornos relacionados con enfermedades autoinmunitarias incluyen artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artrosis, artritis psoriásica), psoriasis, dermatitis incluida la dermatitis atópica; la urticaria crónica autoinmunitaria, polimiositis/dermatomiositis, necrosis epidérmica crónica, escleroderma sistémico y esclerosis, respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), meningitis, rinitis alérgica, encefalitis, uveítis, colitis, glomerulonefritis, dolencias alérgicas, eccema, asma, dolencias que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus sistémico eritematoso (LSE), lupus (que incluye nefritis, no renal, discoide, alopecia), diabetes de inicio juvenil, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica, respuestas inmunitarias asociadas con una hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por las citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis, incluida la granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis (incluida ANCA), anemia aplásica, anemia positiva de Coombs, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, anemia hemolítica inmunitaria que incluye la anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), deficiencia en factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican la diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión multiorgánica, miastenia gravis, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténico de Lambert-Eaton,

síndrome de Raynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo al trasplante de órgano sólido (incluido el pretratamiento de los títulos elevados de anticuerpos reactivos del panel, depósitos de IgA en tejidos, etc), enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), penfigoide ampolloso, pénfigo (todos, incluido el común y el foliar), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, arteritis de células gigantes, nefritis del complejo inmunitario, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM o polineuropatías mediadas por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del testículo y ovario incluidas la orquitis autoinmunitaria y la ooforitis, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluida la tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromas poliglandulares endocrinopáticos), diabetes Tipo I, también denominada como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfocítica (VIH), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de vasos grandes (incluida la polimialgia reumática y la arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos intermedios (incluyendo la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa), espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), glomerulonefritis de progresión rápida, cirrosis biliar primaria, Celiaca (enteropatía por gluten), crioglobulinemia, ELA, arteriopatía coronaria.

Los cánceres positivos para CD20 son los que comprenden una proliferación anómala de células que expresan CD20 sobre la superficie celular. Las neoplasias de células B positivas para CD20 incluyen la enfermedad de Hodgkin positiva para CD20 que incluye la enfermedad de Hodgkin con predominancia de linfocitos (LPHD); linfoma no de Hodgkin (LNH); linfomas del centro celular folicular (FCC); leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia de células pilosas. El linfoma no de Hodgkin incluye el linfoma no de Hodgkin (LNH) de bajo grado o folicular, linfoma linfocítico pequeño (SLL), LNH de grado intermedio o folicular, LNH de grado intermedio difuso, LNH inmunoblástico de alto grado, LNH linfoblástico de alto grado, LNH no escindido microcítico de alto grado, enfermedad LNH voluminosa, linfoma linfocítico plasmacitoide, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con SIDA y macroglobulinemia de Waldenstrom. También se incluye el tratamiento de las recidivas de estos cánceres. LPHD es un tipo de enfermedad de Hodgkin que tiende a frecuentes recaídas a pesar del tratamiento con radioterapia o quimioterapia, y se caracteriza por células malignas positivas para CD20. La CLL es uno de los cuatro tipos principales de leucemia. Un cáncer de las células B maduras, denominadas linfocitos, la CLL se manifiesta por la acumulación progresiva de las células en la sangre, médula ósea y tejidos linfáticos.

En realizaciones específicas, los anticuerpos de unión a CD20 específicos y los fragmentos funcionales del mismo son para su uso en el tratamiento del linfoma no de Hodgkin (LNH), enfermedad de Hodgkin predominante de linfocitos (LPHD), linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia linfocítica crónica, artritis reumatoide y artritis reumatoide juvenil, lupus sistémico eritematoso (SLE) incluida la nefritis lúpica, enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjorgen y glomerulonefritis.

Los anticuerpos de unión a CD20 humanizados o fragmentos funcionales de los mismos son útiles como tratamiento en monoterapia, por ejemplo, para el LNH de células B positivo para CD20 de bajo grado o folicular, o se puede administrar a pacientes junto con otros fármacos en un régimen multitierapia.

El linfoma indolente es una enfermedad incurable de tratamiento lento en la que el paciente promedio sobrevive de media entre seis y 10 años, tras numerosos periodos de remisión y recidiva. En una realización, los anticuerpos de unión a CD20 humanizados o fragmentos funcionales de los mismos son útiles para tratar el LNH indolente.

Los parámetros para evaluar la eficacia o el éxito del tratamiento de la neoplasia son conocidos del médico experto en el caso adecuado. En general, el médico experto buscará la reducción en los signos y síntomas de la enfermedad específica. Los parámetros pueden incluir la mediana de tiempo transcurrido hasta el progreso de la enfermedad, tiempo en remisión, enfermedad estable.

Las siguientes referencias describen linfomas y CLL, sus diagnósticos, tratamientos y procedimientos médicos estándar para medir la eficacia del tratamiento.

Las siguientes referencias describen linfomas y CLL, sus diagnósticos, tratamientos y procedimientos médicos estándar para medir la eficacia del tratamiento. Canellos GP, Lister, TA, Sklar JL: The Lymphomas. W.B.Saunders Company, Filadelfia, 1998; van Besien K y Cabanillas, F: Clinical Manifestations, Staging and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma, Cáp. 70, págs. 1293-1338, en: Hematology, Basic Principles and Practice, 3ª ed. Hoffman et al. (Editores). Churchill Livingstone, Filadelfia, 2000; y Rai, K y Patel, D: Chronic Lymphocytic Leukemia, Cáp. 72, págs. 1350-1362, en: Hematology, Basic Principles and Practice, 3ª ed. Hoffman et al. (Editores). Churchill Livingstone, Filadelfia, 2000.

Los parámetros para evaluar la eficacia o el éxito del tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o relacionada con una enfermedad autoinmunitaria son conocidos del médico experto en la enfermedad correspondiente. En

general, el médico experto buscará la reducción en los signos y síntomas de la enfermedad específica. Se proporciona lo siguiente a modo de ejemplo.

5 En una realización, los anticuerpos de la invención son útiles para tratar la artritis reumatoide. La AR se caracteriza por una inflamación de varias articulaciones, pérdida de cartílago y erosión ósea que da lugar a la destrucción de la articulación y, finalmente, a un funcionamiento articular reducido. Además, como la AR es una enfermedad sistémica, puede tener efectos en otros tejidos tales como los pulmones, ojos y médula ósea. Menos del 50 por ciento de los pacientes que han padecido AR durante 10 años o más pueden continuar trabajando o actuar con normalidad diariamente.

10 Los anticuerpos se pueden usar como tratamiento de primera línea en pacientes con AR temprana (es decir, no tratados con metotrexato (MTX)) y en forma de monoterapia, o en combinación con, por ejemplo, MTX o ciclofosfamida. O bien, los anticuerpos se pueden usar como tratamiento de segunda línea para pacientes resistentes a DMARD y/o MTX, tanto en monoterapia como junto con, por ejemplo, MTX. Los anticuerpos de unión a CD20 humanizados son útiles para prevenir y controlar el daño articular, retrasar el daño estructural, disminuir el dolor asociado con la inflamación en la AR, y de forma general, para reducir los signos y síntomas en la AR de moderada a grave. El paciente de AR se puede tratar con el anticuerpo CD20 humanizado antes de, después, o junto con el tratamiento con otros fármacos utilizados en el tratamiento de la AR (véase el tratamiento en combinación, más adelante). En una realización, los pacientes con un fracaso anterior con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad y/o que hayan tenido una respuesta inadecuada al metotrexato en solitario se tratan con un anticuerpo de unión a CD20 humanizado de la invención. En una realización de este tratamiento, los pacientes siguen un régimen de tratamiento de 17 días durante el que reciben el anticuerpo de unión a CD20 humanizado solo (infusiones iv de 1g en los días 1 y 15); anticuerpo de unión a CD20 junto con ciclofosfamida (infusión iv de 750 mg los días 3 y 17); o anticuerpo de unión a CD20 junto con metotrexato.

25 Un método para evaluar la eficacia del tratamiento en la AR se basa en los criterios del American College of Rheumatology (ACR), que miden el porcentaje de mejora en articulaciones sensibles a la palpación e inflamadas, entre otras cosas. El paciente de RA puede recibir una puntuación en, por ejemplo, ACR 20 (20 por ciento de mejora) en comparación con no usar tratamiento con anticuerpos (por ejemplo, el nivel inicial antes del tratamiento) o tratamiento con placebo. Otras formas de evaluar la eficacia de un tratamiento con anticuerpos incluyen la puntuación mediante rayos X, tal como la tabla de puntuación Sharp X-ray, utilizada para puntuar daños estructurales tales como erosión ósea y estrechamiento del espacio articular. Los pacientes también se pueden evaluar para la prevención o a mejora en la discapacidad, basándose en la puntuación del cuestionario de evaluación de la salud [HAQ], puntuación AIMS, SF-36 en periodos de tiempo durante o después del tratamiento. Los criterios ACR 20 pueden incluir un 20 % de mejora en el recuento tanto de articulaciones sensibles a la palpación (dolorosas) y de articulaciones dolorosas, junto con un 20 % de mejora en al menos 3 de las 5 medidas siguientes:

- 40 1. evaluación del dolor del paciente mediante la escala analógica visual (EAV),
2. evaluación global del paciente de la actividad con la enfermedad (VAS),
3. evaluación global del médico de la actividad con la enfermedad (VAS),
4. discapacidad autoevaluada por el paciente medida según el Health Assessment Questionnaire, y
5. reactivos en fase aguda, CRP o ESR.

45 La ACR 50 y 70 se definen de forma análoga. Preferentemente, se administra al paciente una cantidad de un anticuerpo de unión a CD20 de la invención eficaz para conseguir al menos una puntuación de ACR 20, preferentemente al menos ACR 30, de forma más preferente al menos ACR 50, incluso de forma más preferente al menos un ACR 70, lo más preferible, al menos un ACR 75 y superior.

50 La artritis psoriásica tiene características radiológicas únicas y diferenciadas. Para la artritis psoriásica, la erosión de la articulación y el estrechamiento del espacio articular se pueden evaluar también mediante la puntuación de Sharp. Los anticuerpos de unión a CD20 humanizados de la invención se pueden usar para prevenir el daño articular, así como reducir los signos y síntomas del trastorno.

55 Otro aspecto más de la invención se refiere a un método para tratar el lupus o el SLE mediante la administración a un paciente que padece SLE, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de unión a CD20 humanizado de la invención. Las puntuaciones SLEDAI proporcionan una cuantificación numérica de la actividad de la enfermedad. El SLEDAI es un índice ponderado de 24 parámetros clínicos y de laboratorios conocidos por su correlación con la actividad de la enfermedad, con un intervalo numérico de 0-103. Véanse Bryan Gescuk y John Davis, "Novel therapeutic agent for systemic lupus erythematosus" en Current Opinion in Rheumatology 2002, 14:515-521. Se cree que los anticuerpos dirigidos contra el ADN bicatenario ocasionan agudizaciones renales y otras manifestaciones de lupus. Los pacientes sometidos a tratamiento con anticuerpo se controlan en el tiempo para determinar las agudizaciones renales, que se definen como un importante aumento reproducible de creatinina sérica, proteína en orina o sangre en orina. Como alternativa o adicionalmente, se puede realizar un seguimiento de los niveles de anticuerpos antinucleares y anticuerpos dirigidos contra el ADN bicatenario en los pacientes. Los tratamientos del SLE incluyen altas dosis de corticoesteroides y/o ciclofosfamida (HDCC).

Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos de las articulaciones, incluyendo espondilitis anquilosante, artritis psoriásica o enfermedad de Crohn. El éxito del tratamiento se puede determinar mediante herramientas de medición para la evaluación global validadas por el médico y el paciente.

5 Se utilizan varias medicaciones para tratar la psoriasis; el tratamiento es diferente directamente en relación con la gravedad de la enfermedad. Los pacientes con una forma más leve de la psoriasis suelen utilizar tratamientos tópicos, tales como los esteroides tópicos, antralina, calcipotriena, clobetasol, y tazaroteno, para gestionar la enfermedad, mientras que es más probable que los pacientes con psoriasis moderada y grave utilicen tratamientos sistémicos (metotrexato, retinoides, ciclosporina, PUVA y UVB). También se usan alquitranes. Estos tratamientos tienen una combinación de problemas de seguridad, pautas de tratamiento que requieren tiempo, o procesos de tratamiento incómodos. Además, algunos requieren un equipo costoso y espacio de uso exclusivo en la consulta. Las medicaciones sistémicas pueden producir efectos secundarios graves, que incluyen hipertensión, hiperlipidemia, supresión de médula ósea, enfermedad hepática, enfermedad renal y colapso gastrointestinal. Además, el uso de la fototerapia puede aumentar la incidencia de los cánceres de piel. Además de la incomodidad y el malestar asociados con el uso de terapias tópicas, la fototerapia y los tratamientos sistémicos requieren que los pacientes entren y salgan continuamente de la terapia, y el control de la exposición durante toda la vida debido a sus efectos secundarios.

20 La eficacia del tratamiento de la psoriasis se evalúa controlando los cambios en los síntomas y signos clínicos de la enfermedad incluidos los cambios en las puntuaciones de la evaluación global del médico (PGA) y el índice de área y gravedad de la psoriasis (PASI), evaluación de los síntomas de la psoriasis (PSA), en comparación con el estado inicial. El paciente se puede medir periódicamente durante el tratamiento en la escala visual analógica para indicar el grado de picor experimentado en puntos temporales específicos.

25 Los pacientes pueden experimentar una reacción ante la infusión o síntomas relacionados con la infusión en su primera infusión de un anticuerpo terapéutica. La gravedad de estos síntomas varía y, en general, son reversibles con intervención médica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, fiebre de tipo gripal, escalofríos leves/intensos, náuseas, urticaria, cefalea, broncoespasmo, angioedema. Para el tratamiento de la enfermedad, serían deseables los métodos de tratamiento de la presente invención para minimizar las reacciones a la infusión. Por lo tanto, otro aspecto de la invención es un método para tratar las enfermedades divulgadas mediante la administración de un anticuerpo de unión a CD20 humanizado en el que el anticuerpo tiene una citotoxicidad reducida o no dependiente del complemento y da como resultado una reducción en los síntomas relacionados con la infusión en comparación con el tratamiento con Rituxan®. En una realización, el anticuerpo de unión a CD20 humanizado es 2H7.v116.

35 *Dosificación*

Dependiendo de la indicación a tratar y de los factores relevantes para la dosificación con los que un médico con experiencia en el campo estaría familiarizado, los anticuerpos de la invención se pueden administrar a una dosis que resulta eficaz para el tratamiento de dicha indicación a la vez que se minimizan la toxicidad y los efectos secundarios. Para el tratamiento de un cáncer positivo para CD20, o una enfermedad autoinmunitaria, la dosificación terapéuticamente eficaz estará comprendida en el intervalo de aproximadamente 250 mg/m², a aproximadamente 400 mg/m² o 500 mg/m², preferentemente de aproximadamente 250-375 mg/m². En una realización, el intervalo de dosificación es de 275-375 mg/m². En una realización del tratamiento de una neoplasia de células B positiva para CD20, el anticuerpo se administra en un intervalo de 300-375 mg/m². Para el tratamiento de pacientes que padecen un linfoma de células B tales como un linfoma no de Hodgkins, los anticuerpos dirigidos contra CD20 y los anticuerpos dirigidos contra CD20 humanizados de la invención se pueden aplicar a un paciente humano a una dosis de 10 mg/kg o 375 mg/m². Para el tratamiento del LNH, un régimen de dosificación sería administrar una dosis de la composición de anticuerpo a una dosificación de 10 mg/kg durante la primera semana de tratamiento, seguido por un intervalo de 2 semanas, después, se administra una segunda dosis con la misma cantidad de anticuerpos. En general, los pacientes de LNH reciben dicho tratamiento una vez al año pero ante la recurrencia del linfoma, dicho tratamiento se puede repetir. En otro régimen de dosificación, los pacientes tratados que padecen LNH de grado bajo reciben una versión del 2H7 humanizado, preferentemente v16 (375 mg/m² semanalmente) seguido en la semana cinco por tres ciclos adicionales del anticuerpo junto con la quimioterapia habitual CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) o CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona), que se proporciona cada tres semanas durante tres ciclos.

60 Para tratar la artritis reumatoide, en una realización, el intervalo de dosificación para el anticuerpo humanizado es de 125 mg/m² (equivalente a aproximadamente 200 mg/dosis) a 600 mg/m², administrada en dos dosis, por ejemplo, la primera dosis de 200 mg se administra un día seguido de una segunda dosis de 200 mg en el día 15. En diferentes realizaciones, la dosis es de 250 mg/dosis, 275 mg, 300 mg, 325 mg, 350 mg, 375 mg, 400 mg, 425 mg, 450 mg, 475 mg, 500 mg, 525 mg, 550 mg, 575 mg, 600 mg.

65 En el tratamiento de la enfermedad, los anticuerpos de unión a CD20 de la invención se pueden administrar al paciente de forma crónica o intermitente, según determine el médico experto en la enfermedad.

Un paciente que recibe un fármaco mediante infusión intravenosa o por vía subcutánea puede experimentar efectos adversos tales como fiebre, escalofríos, sensación de ardor, astenia y cefalea. Para aliviar o minimizar dichos efectos adversos, el paciente puede recibir una o varias dosis iniciales de acondicionamiento del anticuerpo seguido de una dosis terapéutica. La una o varias dosis de acondicionamiento serán menores que la dosis terapéutica para preparar al paciente para tolerar las dosis más altas.

Vía de administración

Los anticuerpos de unión a CD20 son para administrarse a un paciente humano de acuerdo con los métodos conocidos, tales como mediante administración intravenosa, *por ejemplo*, como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, intraarticular, intrasinoval intratecal, o por inhalación, en general mediante administración intravenosa o subcutánea.

Un anticuerpo 2H7 humanizado puede estar destinado a la administración mediante infusión intravenosa con una solución de cloruro sódico al 0,9 % como vehículo de infusión.

Terapia de combinación

En el tratamiento de las neoplasias de células B que se han descrito anteriormente, el paciente se puede tratar con los anticuerpos de unión a CD20 de la presente invención junto con uno o más agentes terapéuticos tales como un agente quimioterapéutico en un tratamiento multifármaco. El anticuerpo de unión a CD20 se puede administrar de forma paralela, secuencial o alternante con el agente quimioterapéutico, o después de no responder a otra terapia. La quimioterapia habitual para el tratamiento del linfoma puede incluir ciclofosfamida, citarabina, melfalano y mitoxantrona junto con melfalano. CHOP es una de las pautas de quimioterapia más habituales para tratar el linfoma no de Hodgkin. Se indican a continuación los fármacos usados en el régimen CHOP: ciclofosfamida (marcas comerciales cytoxan, neosar); adriamicina (doxorubicina / hidroxidoxorubicina); vincristina (Oncovin); y prednisolona (a veces llamada Deltasona u Orasona). El anticuerpo de unión a CD20 se puede administrar al paciente que lo necesita junto con uno o más de los siguientes agentes quimioterapéuticos de doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y prednisolona. Un paciente que padece un linfoma (tal como un linfoma no de Hodgkin) se puede tratar con un anticuerpo dirigido contra CD20 de la presente invención junto con terapia CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). Un paciente con cáncer se puede tratar con un anticuerpo de unión a CD20 humanizado de la invención combinado con quimioterapia CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona). Un paciente que padece LNH positivo para CD20 se puede tratar con 2H7.v16 humanizado junto con CVP. En el tratamiento de la CLL, se puede administrar un anticuerpo de unión a CD20 junto con la quimioterapia con uno o ambos de fludarabina y citoxano.

En el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias o de las dolencias relacionadas con enfermedades autoinmunitarias anteriormente descritas, el paciente se puede tratar con los anticuerpos de unión a CD20 de la presente invención junto con un segundo agente terapéutico, tal como un agente inmunosupresor, tal como en un régimen multifármaco. El anticuerpo de unión a CD20 se puede administrar de forma paralela, secuencial o alternante con el agente inmunosupresor, o cuando no responde a otra terapia. El agente inmunosupresor se puede administrar a la misma dosis o a una dosis inferior de lo establecido en la técnica. El agente inmunosupresor complementario preferido dependerá de muchos factores, entre los que se incluyen el tipo de trastorno que se está tratando, así como los antecedentes médicos del paciente.

"Agente inmunosupresor" tal como se usa en el presente documento para el tratamiento complementario se refiere a sustancias que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmunitario de un paciente. Dichos agentes incluirían sustancias que suprimen la producción de citoquinas, regulan defectivamente, o suprimen, la expresión de autoantígenos, o enmascaran los antígenos MHC. Los ejemplos de estos agentes incluyen esteroides tales como glucocorticoesteroides, *por ejemplo*, prednisona, metilprednisolona, y dexametasona; pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-sustituidas (véase la patente de Estados Unidos n.º 4.665.077), azatioprina (o ciclofosfamida, si hay reacción adversa a la azatioprina); bromocriptina; glutaraldehído (que enmascara los antígenos MHC, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.120.649); anticuerpos contra idiotipo de antígenos MHC y fragmentos MHC; ciclosporina A; citoquinas o antagonistas del receptor de citoquinas incluyendo los anticuerpos dirigidos contra el interferón γ , β , o α ; anticuerpos dirigidos contra el factor de necrosis tumoral α ; anticuerpos dirigidos contra el factor de necrosis tumoral β ; anticuerpos dirigidos contra interleuquina 2 y anticuerpos dirigidos contra el receptor de IL-2; anticuerpos dirigidos contra L3T4; globulina heteróloga dirigida contra linfocitos; anticuerpos pan-T, preferentemente anticuerpos dirigidos contra CD3 o CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (documento WO 90/08187 publicado el 26 de julio de 1990); estreptocinasa; TGF- β ; estreptodomasia; ARN o ADN del hospedador; FK506; RS-61443; deoxispergualina; rapamicina; receptor de células T (patente de Estados Unidos n.º 5.114.721); fragmentos del receptor de células T (Offner et al., Science 251:430-432 (1991); documento WO 90/11294; y WO 91/01133); y anticuerpos del receptor de células T (documento EP 340.109) tales como T10B9.

Para el tratamiento de la artritis reumatoide, el paciente se puede tratar con un anticuerpo CD20 de la invención junto con uno o más de los siguientes fármacos: DMARDS (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (por ejemplo, metotrexato), AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo), HUMIRA™ (adalimumab;

Abbott Laboratories), AR-AVA® (leflunomida), REMICADE® (infliximab; Centocor Inc., de Malvern, Pa), ENBREL (etanercept; Immunex, WA), inhibidores de COX-2. Los DMARD habitualmente usados en la AR son hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab, azatioprina, D-penicilamina, oro (oral), oro (intramuscular), minociclina, ciclosporina, inmunoadsorción de proteína A de estafilococo. Adalimumab es un anticuerpo monoclonal humano que se une a TNF α . Infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une a TNF α . Etanercept es una proteína de fusión de "inmuno adhesina" que consiste en la porción de unión al ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral de 75 kD (p75) humano (TNFR) unido a la porción Fc de una IgG1 humana. Para el tratamiento convencional de la AR, véanse, por ejemplo, "Guidelines for the management of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheumatism* 46(2): 328-346 (febrero de 2002). En una realización específica, el paciente de AR se trata con un anticuerpo de CD20 de la invención junto con metotrexato (MTX). Una dosis ilustrativa de MTX es de aproximadamente 7,5-25 mg/kg/sem. El MTX se puede administrar por vía oral y por vía subcutánea.

Para el tratamiento de la espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y enfermedad de Crohn, el paciente se puede tratar con los anticuerpos de unión a CD20 de la invención junto con, por ejemplo, Remicade® (infliximab; de Centocor Inc., de Malvern, Pa.), ENBREL (etanercept; Immunex, WA).

Los tratamientos del SLE incluyen altas dosis de corticoesteroides y/o ciclofosfamida (HDCC).

Para el tratamiento de la psoriasis, los pacientes pueden recibir un anticuerpo de unión a CD20 junto con los tratamientos tópicos, tales como los esteroides tópicos, antralina, calcipotriena, clobetasol, y tazarotene, o con metotrexato, retinoides, ciclosporina, tratamientos PUVA y UVB. Un paciente de psoriasis se puede tratar con el anticuerpo de unión a CD20 de forma secuencial o paralela con ciclosporina.

25 Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos de unión a CD20 de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando un anticuerpo que tenga el grado deseado de pureza con transportadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los transportadores, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Se describen formulaciones de anticuerpo dirigido contra CD20 ilustrativas en el documento WO98/56418. Otra formulación es una formulación líquida multidosis que comprende el anticuerpo dirigido contra CD20 a 40 mg/ml, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, alcohol bencílico al 0,9 %, polisorbato 20 al 0,02 % a pH 5,0 que tiene una vida útil mínima de dos años en almacenamiento a 2-8°C. Otra formulación de anticuerpo dirigido contra CD20 de interés comprende 10 mg/ml de anticuerpo en 9,0 mg/ml de cloruro de sodio, 7,35 mg/ml de citrato de sodio dihidrato, 0,7 mg/ml de polisorbato 80, y agua estéril para inyección, pH 6,5. Otra formulación farmacéutica acuosa comprende acetato de sodio 10-30 mM de aproximadamente pH 4,8 a aproximadamente pH 5,5, preferentemente a pH 5,5, polisorbato como tensioactivo en una cantidad de aproximadamente 0,01-0,1 % v/v, trehalosa en una cantidad de aproximadamente 2-10 % p/v, y alcohol bencílico como conservante (documento US 6.171.586). Las formulaciones adaptadas para la administración subcutánea se describen en el documento WO97/04801. Dichas formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con un diluyente adecuado hasta conseguir una elevada concentración de la proteína, y la formulación reconstituida se puede administrar por vía subcutánea al mamífero que se va a tratar en el presente documento.

Una formulación del anticuerpo humanizado es un anticuerpo al 12-14 mg/ml en histidina 10 mM, sacarosa al 6 %, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 5,8.

Un anticuerpo de la presente invención y, en particular, 2H7.v16 se puede formular a 20 mg/ml de anticuerpo en sulfato de histidina 10 mM, 60 mg/ml de sacarosa, 0,2 mg/ml de polisorbato 20, y agua estéril para inyección a pH 5,8.

La formulación del presente documento puede contener también más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente un agente

citotóxico, agente quimioterapéutico, citoquina o agente inmunosupresor (por ejemplo, uno que actúa sobre las células T, tal como ciclosporina o un anticuerpo que se une a las células T, por ejemplo, uno que se une a LFA-1). La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tiempo de enfermedad o trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente a las mismas dosis y con rutas de administración que se han descrito anteriormente en el presente documento o de aproximadamente del 1 al 99 % de las dosis empleadas anteriormente.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se han descrito en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, matrices que tienen la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico).

Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* tienen que ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Artículos de fabricación y kits

Se describe en el presente documento un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y dolencias relacionadas y cánceres positivos para CD20 tales como el linfoma no de Hodgkin. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar formados a partir de varios materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa para inyección intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un principio activo de la composición es un anticuerpo de unión a CD20 de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición es de utilidad para tratar la dolencia concreta. La etiqueta o prospecto comprenderá instrucciones para administrar la composición de anticuerpo al paciente. El prospecto se refiere a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos. En una realización, el prospecto indica que la composición es de utilidad para tratar un linfoma no de Hodgkins.

Además, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo envase que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), suero salino tamponado con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Los kits son útiles para varios fines, por ejemplo, en ensayos de eliminación de células R, como control positivo para ensayos de apoptosis, para aplicación o inmunoprecipitación de CD20 a partir de las células. Para aislamiento y purificación de CD20, el kit puede contener un anticuerpo dirigido contra CD20 acoplado a perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa). Los kits se pueden proporcionar con anticuerpos para la detección y cuantificación de CD20 *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o transferencia Western. Como en el caso del artículo de fabricación, el kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. El envase contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo dirigido contra CD20 de la invención. Se pueden incluir envases adicionales que contengan, por ejemplo, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso *in vitro* o diagnóstico previsto.

CD20 de macaco

Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO.:24 de CD20 de macaco se muestra en la Fig. 19. El ácido nucleico puede ser un ADNc. Un ácido nucleico que codifica CD20 de mono puede estar incluido en un vector de expresión para su expresión en una célula hospedadora. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO.:24 del vector de expresión se puede unir operativamente a una secuencia que controla la expresión tal como un promotor o un potenciador. La secuencia de control de la expresión puede ser la secuencia natural normalmente asociada con el gen CD20 de macaco, o bien ser heteróloga respecto al gen.

También se describe un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la [SEQ ID NO.25; Fig. 19 y 20] de CD20 de macaco, así como las células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico de CD20 de macaco. Las células hospedadoras pueden ser células eucariotas, por ejemplo, células CHO. También se contemplan las proteínas de fusión que comprenden la secuencia de aminoácidos de CD20 de macaco, o fragmentos de dicha secuencia.

Ejemplos experimentales

Ejemplo 1

Humanización del anticuerpo monoclonal de murino 2H7 dirigido contra CD20

La humanización del anticuerpo 2H7 de murino (denominado también en el presente documento m2H7, m de murino) dirigido contra CD20 humano, se llevó a cabo en una serie de etapas de mutagénesis dirigida a sitio. Se han descrito las secuencias de la región variable del anticuerpo 2H7 de murino y del 2H7 quimérico con la V de ratón y la C humana, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.846.818 y 6.204.023. Los restos de la CDR de 2H7 se identificaron comparando la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de 2H7 de murino (divulgados en el documento de US 5.846.818) con las secuencias de anticuerpos conocidos (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Ed. 5. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Las regiones de la CDR de las cadenas ligera y pesada se definieron basándose en la hipervariabilidad de la secuencia) (Kabat et al., *supra*) y se muestran en la Fig. 1A y la Fig. 1B, respectivamente. Utilizando los oligonucleótidos sintéticos (Tabla 1), la mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. 82:488-492 (1985)) se utilizó para introducir las seis regiones de la CDR de 2H7 de murino en un marco Fab humano completo que corresponde a una secuencia consenso V_LκI,V_HIII (V_L kappa subgrupo I, V_H subgrupo III) contenida en el plásmido pVX4 (Fig. 2).

Se usó el fagémido pVX4 (Fig. 2) tanto para la mutagénesis como para la expresión de F(ab)s en E. coli. Basándose en el fagémido pb0720, un derivado de pB0475 (Cunningham et al., Science 243: 1330-1336 (1989)), pVX4 contiene un fragmento de ADN que codifica un anticuerpo dirigido contra IFN-α (interferón α) de la cadena ligera del subgrupo κ consenso humanizado (V_LκI-C_L) y de la cadena pesada del subgrupo III consenso humanizado (V_HIII-C_H1). pVX4 tiene también un promotor de la fosfatasa alcalina y una secuencia Shine-Dalgarno, ambos derivados de otro plásmido basado en pUC119 descrito anteriormente, pAK2 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992)). Se introdujo un único sitio de restricción SpeI entre el ADN que codificaba las cadenas ligera y pesada de F(ab). Los primeros 23 aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo dirigido contra IFN-α son la secuencia señal de secreción (Chang et al., Gene 55: 189-196 (1987)).

Para construir la versión CDR-swap de 2H7 (2H7.v2), se llevó a cabo la mutagénesis dirigida a sitio en un molde de pVX4 que contiene desoxiuridina; las seis CDR del anti-IFN-α se cambiaron por las CDR de 2H7 de murino. La molécula resultante se denomina versión 2 de 2H7 humanizado (2H7.v2), o la "versión CDR-swap" de 2H7; tiene los restos de la CDR de m2H7 junto con los restos consenso del FR humano que se muestra en las Figuras 1A y 1B. Se usó 2H7.v2 humanizado para la humanización adicional.

La Tabla 1 muestra la secuencia de oligonucleótidos utilizada para crear cada una de las CDR de 2H7 de murino (m2H7) en la cadena H y la cadena L. Por ejemplo, se utilizó el oligonucleótido CDR-H1 para recrear la CDR1 de la cadena H de m2H7. CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 se refieren a la CDR1 de la cadena H, CDR2 y CDR3, respectivamente; de manera similar, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 se refieren a cada una de las CDR de la cadena L. Las sustituciones en CDR-H2 se llevaron a cabo es dos etapas con dos oligonucleótidos, CDR-H2A y CDR-H2B.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para la construcción de la CDR-swap de las CDR de 2H7 de murino en un marco humano en pVX4. Los restos cambiados en cada oligonucleótido están subrayados.

Sustitución	Secuencia de oligonucleótidos
CDR-H1	C TAC ACC TTC ACG <u>AGC</u> TAT <u>AAC ATG</u> CAC TGG GTC CG (SEQ ID NO.)
CDR-H2A	<u>G ATT AAT CCT GAC AAC GGC GAC ACG AGC TAT AAC CAG AAG</u> <u>TTC AAG GGC CG</u> (SEQ ID NO.)
CDR-H2B	GAA TGG GTT GCA <u>GCG</u> ATC <u>TAT</u> CCT <u>GGC</u> AAC GGC GAC AC (SEQ ID NO.)
CDR-H3	<u>AT TAT TGT GCT CGA GTG GTC TAC TAT AGC AAC AGC TAC TGG</u> <u>TAC TTC GAC GTC TGG GGT CAA GGA</u> (SEQ ID NO.)
CDR-L1	C TGC ACA GCC AGC <u>TCT</u> TCT <u>GTC</u> AGC TAT ATG CAT TG (SEQ ID NO.)
CDR-L2	AA CTA CTG ATT TAC <u>GCT</u> <u>CCA</u> <u>TGC</u> AAC CTC <u>GCG</u> TCT GGA GTC C (SEQ ID NO.)
CDR-L3	<u>TAT TAC TGT CAA CAG TGG AGC TTC AAT CCG CCC</u> ACA TTT GGA

	<u>CAG (SEQ ID NO.)</u>
--	--------------------------

Para la comparación con construcciones humanizadas, se construyó un plásmido que expresa un Fab quimérico de 2H7 Fab (que contiene dominios V_L y V_H murinos y dominios C_L y CH₁ humanos) mediante mutagénesis dirigida al sitio (Kunkel, *supra*) usando oligonucleótidos sintéticos para introducir los restos del marco murino en 2H7.v2. La secuencia de la construcción plásmida resultante para la expresión del Fab quimérico conocido como 2H7.v6.8 se muestra en la Fig. 3. Cada cadena codificada del Fab tiene una secuencia señal de la secreción SflI de 23 aminoácidos como se describa para el pVX4 (Fig. 2) anterior.

Basándose en una comparación de secuencias de los restos marco de 2H7 de murino con el marco consenso V_LI,V_HIII humano (Figuras 1A y 1B) y los anticuerpos previamente humanizados (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289 (1992)), se introdujeron varias mutaciones del marco en la construcción 2H7.v2 Fab mediante mutagénesis dirigida a sitio. Estas mutaciones dan como resultado un cambio de determinados restos consenso humanos en aquellos que se encuentran en el marco 2H7 de murino, en sitios que puede alterar las conformaciones de la CDR o los contactos del antígeno. La versión 3 contenía V_H(R71V, N73K), la versión 4 contenía V_H(R71V), la versión 5 contenía V_H(R71V, N73K) y V_L(L46P), y la versión 6 contenía V_H(R71V, N73K) y V_L(L46P, L47W).

Las versiones Fab humanizadas y quiméricas del anticuerpo m2H7 se expresaron en *E. coli* y se purificaron del siguiente modo. Los plásmidos se transformaron en la cepa XL-1 Blue de *E. coli* (Stratagene, San Diego, CA) para la preparación de ADN bicatenario y monocatenario. Para cada variante, las cadenas ligera y pesada se secuenciaron completamente utilizando el método del didesoxinucleótido (Sequenase, U.S. Biochemical Corp.). Los plásmidos se transformaron en la cepa 16C9 de *E. coli*, un derivado de MM294, se sembraron en placas LB que contenían 5 µg/ml de carbenicilina, y se seleccionó una única colonia para la expresión de la proteína. La única colonia se hizo crecer en 5 ml de LB-100 µg/ml de carbenicilina durante 5-8 h a 37° C. El cultivo de 5 ml se añadió a 500 ml de AP5-100 de µg/ml de carbenicilina y se dejó crecer durante 16 h en un matraz de 4 l con deflectores a 37 °C con medio AP5 que consiste en: 1,5 g de glucosa, 11,0 de Hycase SF, 0,6 g de extracto de levadura (certificado), 0,19 g de MgSO₄ anhidro, 1,07 g de NH₄Cl, 3,73 g de KCl, 1,2 g de NaCl, 120 ml de trietanolamina 1 M, pH 7,4, hasta 1 l de agua y a continuación se filtró a esterilidad a través de un filtro Sealkeen de 0,1 µm.

Las células se recogieron mediante centrifugación en un frasco de centrifuga de 1 l (Nalgene) a 3000xg y se eliminó el sobrenadante. Tras congelar durante 1 h, el aglomerado se volvió a suspender en 25 ml de EDTA 10 mM MES-10 mM frío, pH 5,0 (tampón A). Se añadieron 250 µl de PMSF 0,1M (Sigma) para inhibir la proteólisis y se añadieron 3,5 ml de solución madre de 10 mg/ml de lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma) para ayudar a la lisis de la pared de la célula bacteriana. Tras agitar suavemente en hielo durante 1 h, la muestra se centrifugó a 40.000xg durante 15 min. El sobrenadante se llevó a 50 ml con tampón A y se cargó en una columna DEAE de 2 ml equilibrada con tampón A. A continuación se aplicó flujo pistón a una columna G-Sepharose CL-4B (Pharmacia) (0,5 ml de volumen de lecho) equilibrada con tampón A. Se lavó la columna con 10 ml de tampón A y se eluyó con 3 ml de glicina 0,3 M, pH 3,0, en 1,25 ml de Tris 1 M, pH 8,0. El F(ab) se intercambiaba a continuación con tampón en PBS utilizando un Centricon-30 (Amicon) y se concentró hasta un volumen final de 0,5 ml. Se analizaron geles SDS-PAGE de todos los F(ab) para discernir la pureza y se verificó el peso molecular de cada variante mediante espectrometría de masas por electropulverización.

En los ensayos de unión a ELISA basados en células (descritos a continuación), la unión de los Fab, incluyendo el Fab de 2H7 quimérico, a CD20 fue difícil de detectar. Por lo tanto, las versiones 2H7 Fab se reformaron como anticuerpos IgG1 de longitud completa para los ensayos y la mutagénesis adicional.

Se construyeron plásmidos para la expresión de las IgG de longitud completa subclonando los dominios V_L y V_H del 2H7 (v6.8) Fab quimérico, así como las versiones 2 a 6 del Fab humanizado en vectores pRK descritos anteriormente para su expresión de células de mamífero (Gorman et al.; DNA Prot. Eng. Tech. 2:3-10 (1990)). En resumen, cada construcción Fab se digirió con *EcoRV* y *BspI* para escindir un fragmento V_L, que se clonó en los sitios *EcoRV/BspI* del plásmido pDR1 (Fig. 4) para la expresión de la cadena ligera completa (DOMINIOS V_L-C_L). Además, cada construcción de Fab se digirió con *PvuII* y *Apal* para escindir un fragmento V_H, que se clonó en los sitios *PvuII/Apal* del plásmido pDR2 (Fig. 5) para la expresión de la cadena pesada completa (dominios V_H-CH₁-Nnge-CH₂-CH₃). Para cada variante de IgG, se realizaron las transfecciones transitorias transfectando simultáneamente un plásmido que expresa la cadena ligera y un plásmido que expresa la cadena pesada en una línea de células de riñón embrionario humano transformadas con adenovirus, 293 (Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59-74, (1977)). En resumen, células 293 se dividieron en el día antes de la transfección, y se sembraron en placas en medio que contenía suero. Al día siguiente, se añadió ADN bicatenario preparado como un precipitado de fosfato de calcio, seguido por ADN pAdVantage™ (Promega, Madison, WI), y se incubaron las células durante la noche a 37 °C. Se cultivaron las células en medio exento de suero y se recogieron después de 4 días. Los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo utilizando la proteína A-Sepharose CL-4B, a continuación, el tampón se intercambiaba en succinato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0 y se concentró utilizando un Centricon-10 (Amicon). Se determinaron las concentraciones de proteínas mediante el análisis cuantitativo de aminoácidos.

Para medir las afinidades de unión relativas al antígeno CD20, se desarrolló un ensayo ELISA de tipo celular. Células WIL2-S de B-linfoblastoide humano (ATCC CRL 8885, American Type Culture Collection, Rockville, MD) se hicieron crecer en RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 20 mM, pH 7,2 y suero de feto bovino inactivado térmicamente al 10 % en una incubadora de CO₂ al 5 % humidificada. Las células se lavaron con PBS que contenía FBS al 1 % (tampón de ensayo) y se sembraron a 250-300.000 células/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). El patrón se diluyó en serie dos veces (15,6-1000 ng/ml de IgG quimérica de 2H7 v6.8) y las muestras diluidas en serie tres veces (2,7-2000 ng/ml) en tampón de ensayo se añadieron a las placas. Las placas se enterraron en hielo y se incubaron durante 45 min. Para eliminar el anticuerpo no unido, se añadió 0,1 ml de tampón de ensayo a los pocillos. Las placas se centrifugaron y se retiraron los sobrenadantes. Se lavaron las células dos veces más con 0,2 ml de tampón de ensayo. Se detectó el anticuerpo unido a las placas añadiendo anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa dirigido contra Fc humano (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a las placas. Después de una incubación de 45 min, se lavaron las células como se ha descrito anteriormente. El sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametil benzidina; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) se añadió a las placas. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido fosfórico 1 M. Se ajustaron las curvas de titulación con un programa de ajuste de una curva de regresión no lineal de cuatro parámetros (KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA). Se determinaron la absorbancia en el punto medio de la curva de titulación (mid-OD) y su concentración correspondiente del patrón. A continuación se determinó la concentración de cada variante en esta mid-OD y la concentración del patrón se dividió por la de cada variante. Por tanto, los valores son una índice de la unión de cada variante con respecto al patrón. Las desviaciones estándar en la afinidad relativa (concentración equivalente) fueron generalmente +/-10 % entre los experimentos.

Como se muestra en la Tabla 2, la unión de la variante CDR-swap (v.2) fue extremadamente reducida en comparación con el 2H7 quimérico (v.6.8). Sin embargo, las versiones 3 a 6 mostraron una unión mejorada. Para determinar el número mínimo de mutaciones que pueden requerirse para restaurar la afinidad de unión a la del 2H7 quimérico, se construyeron mutaciones y combinaciones adicionales de mutaciones mediante la mutagénesis dirigida a sitio para producir las variantes 7 a 17 como se indica en la Tabla 2. En particular, estas incluyeron las mutaciones de V_H A49G, F67A, I69L, N73K, y L78A; y las mutaciones de V_L M4L, M33I, y F71Y. Las versiones 16 y 17 mostraron las mejores afinidades de unión relativas, del doble de las de la versión quimérica, sin diferencias significativas (s.d. = +/-10 %) entre las dos. Para minimizar el número de mutaciones, la versión 16, que tiene solo 4 mutaciones de los restos del marco humano a restos de marco de murino (Tabla 2) se seleccionaron de esta manera como la forma humanizada para su caracterización adicional.

Tabla 2. Afinidad de unión relativa de las variantes de IgG de 2H7 humanizadas para CD20 en comparación con el ELISA de 2H7 quimérico de tipo celular. La unión relativa se expresa como la concentración del 2H7 quimérico respecto a la concentración de la variante requerida para la unión equivalente; por tanto, una relación <1 indica una afinidad más débil por la variante. Desviación estándar en la determinación de la afinidad relativa promedió +/-10 %. Las sustituciones del marco en los dominios variables son relativas a la versión CDR-swap de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., *anteriormente citado*).

Versión 2H7	Sustituciones de la cadena pesada (V _H)	Sustituciones de la cadena ligera (V _L)	Unión relativa
6,8	(Quimera)	(Quimera)	-1-
2	(CDR swap)	(CDR swap)	0,01
3	R71V, N73K	(CDR swap)	0,21
4	R71V	(CDR swap)	0,21
5	R71V, N73K	L46P	0,50
6	R71V, N73K	L46P, L47W	0,58
7	R71V	L46P	0,33
8	R71V, L78A	L46P	0,19
9	R71V, F67A	L46P	0,07
10	R71V, F67A, I69L	L46P	0,12
11	R71V, F67A, L78A	L46P	0,19
12	R71V	L46P, M4L	0,32
13	R71V	L46P, M33I	0,31
14	R71V	L46P, F71Y	0,25
15	R71V	L46P, M4L, M33I	0,26
16	R71V, N73K, A49G	L46P	0,65
17	R71V, N73K, A49G	L46P, L47W	0,67

Tabla 3 Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para la construcción de mutaciones V_H(A49G, R71V, N73K) y V_L(L46P) en la versión 16 de 2H7 humanizado (2H7.v16). Los codones subrayados codifican las sustituciones de aminoácidos indicadas. Para V_H(R71V, N73K) y V_L(L46P), los oligonucleótidos se muestran como la hebra de sentido directo ya que se usaron para la mutagénesis en el molde de Fab, mientras que para V_H(A49G), el oligonucleótido se muestra como la hebra de sentido contrario, ya que se usó con el molde de pRK (cadena pesada de IgG). En la Fig. 6 y la Fig. 7 se muestra la secuencia de proteínas de la versión 16.

Sustitución	Secuencia de oligonucleótidos
V _H (K71V, N73K)	GT TTC ACT ATA AGT <u>GTC GAC AAG</u> TCC AAA AAC ACA TT (SEQ ID NO. _)
V _H (A49G)	GCCAGGATAGATGGCGCCAACCCATTCCAGGCC (SEQ ID NO. _)
V _L (L46P)	AAGCTCCGAAACCACTGATTTACGCT (SEQ ID NO. _)

Ejemplo 2

Determinantes de unión a antígeno (parátipo) de 2H7

5 Se prepararon las sustituciones de alanina (Cunningham & Wells, Science 244: 1081-1085 (1989) en 2H7.v16 o 2H7.v17 para someter a ensayo las contribuciones de las cadenas laterales individuales del anticuerpo en la unión a CD20. Las variantes de IgG se expresaron en células 293 a partir de vectores pDR1 y pDR2, se purificaron y se evaluaron para determinar la afinidad de unión relativa como se ha descrito anteriormente. Varias sustituciones de la alanina dieron como resultado disminuciones significativas en la unión relativa a CD20 en células WIL-2S (Tabla 4).

15 Tabla 4. Efectos de las sustituciones de alanina en las regiones CDR de 2H7.v16 humanizado medido utilizando ELISA de tipo celular (células WIL2-S). La unión relativa se expresa como la concentración del 2H7.v16 precursor respecto a la concentración de la variante requerida para la unión equivalente; por tanto, una relación <1 indica una afinidad más débil por la variante; una relación >1 indica mayor afinidad por la variante. Desviación estándar en la determinación de la afinidad relativa promedió +/-10 %. Las sustituciones del marco en los dominios variables son relativas a 2H7.v16 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., *anteriormente citado*). NBD significa unión no detectable. Los dos números de la versión 45 proceden de experimentos diferentes.

2H7 versión	CDR localización	Cadena pesada sustituciones	Cadena ligera sustituciones	Unión relativa
16	-	-	-	-1-
140	H1	G26A	-	0,63
141	H1	Y27A	-	0,47
34	H1	T28A	-	0,86
35	H1	F29A	-	0,07
36	H1	T30A	-	0,81
37	H1	S31A	-	0,97
142	H1	Y32A	-	0,63
143	H1	N33A	-	NDB
144	H1	M34A	-	1,2
145	H1	H35A	-	<0,25
146	H2	A50G	-	0,31
147	H2	I51A	-	0,65
38	H2	Y52A	-	0,01
148	H2	P52aA	-	0,66
39	H2	G53A	-	0,89
67	H2	N54A	-	1,4
40	H2	G55A	-	0,79
41	H2	D56A	-	2,0
89	H2	T57A	-	0,61
90	H2	S58A	-	0,92
91	H2	Y59A	-	0,74
92	H2	N60A	-	0,80
93	H2	Q61A	-	0,83
94	H2	K62A	-	0,44
95	H2	F63A	-	0,51
83	H2	V71A	-	0,96
149	H2	K64A	-	0,82
150	H2	G65A	-	1,2
153	H3	V95A	-	0,89
42	H3	V96A	-	0,98
43	H3	Y97A	-	0,63
44	H3	Y98A	-	0,40

45	H3	399A	-	0,84; 0,92
46	H3	N100A	-	0,81
47	H3	S100aA	-	0,85
48	H3	Y100bA	-	0,78
49	H3	W100cA	-	0,02
59	H3	Y100dA	-	0,98
60	H3	F100eA	-	NDB
61	H3	D101A	-	0,31
151	H3	V102A	-	1,1
117	L1	-	R24A	0,85
118	L1	-	A25G	0,86
119	L1	-	S26A	0,98
120	L1	-	(S27A	0,98
121	L1	-	S28A	1,0
122	L1	-	V29A	0,41
50	L1	-	S30A	0,96
51	L1	-	Y32A	1,0
123	L1	-	M33A	1,0
124	L1	-	H34A	0,21
125	L2	-	A50G	0,92
126	L2	-	P51A	0,88
52	L2	-	S52A	0,80
53	L2	-	N53A	0,76
54	L2	-	L54A	0,60
127	L2	-	A55G	1,1
128	L2	-	S56A	1,1
129	L3	-	Q89A	0,46
130	L3	-	Q90A	<0,22
55	L2	-	W91A	0,88
56	L3	-	S92A	1,1
57	L3	-	F93A	0,36
58	L3	-	N94A	0,61
131	L3	-	P95A	NDB
132	L3	-	P96A	0,18
133	L3	-	T97A	<0,22

Ejemplo 3

Mutaciones adicionales en las regiones de la CDR de 2H7

5 Se sometieron a ensayo también las sustituciones de restos adicionales y las combinaciones de sustituciones en las posiciones de la CDR que se identificaron como importantes mediante el barrido de Ala. Algunas variantes de combinación, particularmente v.96 parecieron unirse más fuertemente que v.16.

10 **Tabla 5.** Efectos de las combinaciones de mutaciones y sustituciones no de alanina en las regiones de la CDR de 2H7.v16 humanizado medido utilizando ELISA basado en células (células WIL2-S). La unión relativa a CD20 se expresó como la concentración del 2H7.v16 precursor sobre la concentración de la variante requerida para la unión equivalente; por tanto, una relación <1 indica una afinidad más débil por la variante; una relación >1 indica mayor afinidad por la variante. Desviación estándar en la determinación de la afinidad relativa promedió +/-10 %. Las sustituciones del marco en los dominios variables son relativas a 2H7.v16 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., *anteriormente citado*).

15

Versión 2H7	Sustituciones de la cadena pesada	Sustituciones de la cadena ligera	Unión relativa
16	-	-	-1-
96	D56A, N100A	S92A	3,5
97	N100G, Y100bl	-	0,99
98	N100S, Y100bl	-	1,6
99	N100G, Y100bl	-	0,80
101	N54S, D56A	-	1,7
102	N54K, D56A	-	0,48

ES 2 633 311 T3

103	D56A, N100A	-	2,1
104	S99T, N100G	-	0,81
105	399G, N100S	-	1,1
106	N100G	-	~ 1
167	S100aG, Y100bS	-	
136	D56A, N100A	S56A, S92A	2,6
137	D56A, N100A	A55G, S92A	2,1
156	D56A, N100A	S26A, S56A, S92A	2,1
107	D56A, N100A, Y100bl	S92A	no expresada
182	Y27W	-	
183	Y27F	-	
184	F29Y	-	
185	F29W	-	
186	Y32F	-	
187	Y32W	-	
188	N33Q	-	
189	N33D	-	
190	N33Y	-	
191	N33S	-	
208	H35S	-	
209	A50S	-	
210	A50R	-	
211	A50V	-	
212	A50L	-	
168	Y52W	-	
169	Y52F	-	0,75
170	N54D	-	0,25
171	N54S	-	1,2
172	D56K	-	1
173	D56R	-	
174	D56H	-	1,5
175	D56E	-	1,2
213	D56S	-	
214	D56G	-	
215	D56N	-	
216	D56Y	-	
176	Y59W	-	
177	Y59F	-	
180	K62R	-	
181	K62D	-	
178	F63W	-	
179	F63Y	-	
157	Y97W	-	0,64
158	Y97F	-	1,2
159	Y98W	-	0,64
160	Y98F	-	0,88
106	N100G	-	
161	W100cY	-	0,05
162	W100cF	-	0,27
163	F100eY	-	0,59
164	F100eW	-	0,71
165	D101N	-	0,64
166	S99G, N100G, S100aD, Y100b eliminados	-	0,99
217	V102Y	-	1,0
207	-	H34Y	
192	-	Q89E	
193	-	Q89N	
194	-	Q90B	

195	-	Q90N	
196	-	W91Y	
197	-	W91F	
205	-	S92N	
206	-	S92G	
198	-	F93Y	
199	-	F93W	
204	-	F93S, N94Y	
200	-	P96L	
201	-	P96Y	
202	-	P96W	
203	-	P96R	

Ejemplo 4

Mutaciones en los sitios de sustituciones de humanización del marco

5 Se sometieron a ensayo también las sustituciones de restos adicionales en las posiciones del marco que se cambiaron durante la humanización en el fondo de 2H7.v16. En particular, Las sustituciones alternativas del marco que no se encontraron ni el 2H7 precursor murino ni en el marco de consenso humano se realizaron en V_L(P46) y V_H(G49, V71, y K73).

10 Estas sustituciones conducen generalmente a pocos cambios en la unión relativa (Tabla 6) indicando que existe cierta flexibilidad en los restos del marco en estas posiciones.

15 **Tabla 6.** Unión relativa en un ensayo de tipo celular (WIL2-S) de sustituciones marco. Las variantes de IgG se muestran con mutaciones con respecto al fondo de 2H7.v16. La unión relativa se expresa como la concentración de la quimera de 2H7.v6.8 sobre la concentración de la variante requerida para la unión equivalente; por tanto, una relación <1 indica una afinidad más débil por la variante; una relación >1 indica mayor afinidad por la variante. Desviación estándar en la determinación de la afinidad relativa promedió +/-10 %. Las sustituciones del marco en los dominios variables son relativas a 2H7.v16 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., *anteriormente citado*). (*) Variantes que se evaluaron con 2H7.v16 como el comparador normalizado; los valores relativos se normalizan al de la quimera.

Versión 2H7	Sustituciones de la cadena pesada	Sustituciones de la cadena ligera	Unión relativa
6,8	(quimera)	(quimera)	-1-
16	-	-	0,64
78	K73R	-	0,72
79	K73H	-	0,49
80	K73Q	-	0,58
81	V71I	-	0,42
82	V71T	-	0,58
83	V71A	-	
84	G49S	-	0,32
85	G49L	-	
86	-	P46E	0,22
87	-	P46V	0,51
88	-	P46T	
108	-G49A, V71T, K73R	S92A, M32L, P46T	0,026*
109	G49A, A49G, V71T, K73R	S92A, M32L, P46T	0,026*
110	K73R, D56A, N100A	S92A, M32L	No expresada
111	G49A, V71T, K73R	-	0,46*
112	G49A, A50G, V71T, K73R	-	0,12*

(*) Variantes que se evaluaron con 2H7.v16 como el comparador normalizado; los valores relativos se normalizan al de la quimera.

Ejemplo 5

25 Variantes de 2H7 humanizadas con funciones efectoras potenciadas

Como 2H7 puede mediar en la lisis de las células B a través de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), los inventores pensaron en producir variantes de 2H7.v16 humanizado con actividad CDC y ADCC mejoradas. Se han descrito las mutaciones de determinados

restos en las regiones Fc de otros anticuerpos (Idusogie et al., J. Immunol. 166:2571-2575 (2001)) para mejorar la CDC a través de la unión potenciada al componente C1q del complemento. Se han descrito también mutaciones (Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001); Presta et al., Biochem. Soc. Trans. 30:487-490 (2002)) para mejorar la ADCC a través de la unión a IgG potenciada para activar los receptores de Fc γ y reducir la unión de IgG a los receptores de Fc γ inhibidores. En particular, se han identificado tres mutaciones que mejoran la actividad de CDC y ADCC: S298A/E333A/K334A (denominada también en el presente documento como mutante o variante triple Ala; la numeración en la región Fc es de acuerdo con el sistema de numeración de la UE; Kabat et al., *anteriormente citado*) como se describe (Idusogie et al., *anteriormente citado* (2001); Shields et al., *anteriormente citado*).

Para potenciar la actividad de CDC y ADCC de 2H7, se construyó un mutante triple Ala del 2H7 Fc. Se ha producido una variante humanizada del anticuerpo 4d5 dirigido contra HER2 con las mutaciones S298A/E333A/K334A y se conoce como 4D5Fc110 (es decir, IgG1 anti-p¹⁸⁵HER2 (S298A/E333A/K334A); Shields et al., *anteriormente citado*). Un plasmido, p4D5Fc110 que codifica el anticuerpo 4D5Fc110 (Shields et al., *anteriormente citado*) se dirigió con *Apal* y *HindIII*, y el fragmento Fc (que contenía las mutaciones S298A/E333A/K334A) se ligó en los sitios *Apal*/*HindIII* del vector pDR2-v16 de la cadena pesada de 2H7, para producir pDR2-v31. En la Fig. 8 se muestra la secuencia de aminoácidos de la versión 31 de la cadena H completa. La cadena L es la misma que la de v16.

Aunque los dominios constantes de la región Fc de los anticuerpos IgG1 se conservan relativamente en una especie dada, existen variaciones alélicas (revisadas por Lefranc y Lefranc, en *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function, and regulation*, págs. 43-78, F. Shakib (ed.), Pergamon Press, Oxford (1990)).

Tabla 7. Efectos de las sustituciones en la región Fc sobre la unión a CD20. Se midió la unión relativa a CD20 en un ensayo de tipo celular (WIL2-S) de sustituciones del marco. Las mutaciones Fc (*) se indican mediante la numeración de la UE (Kabat, *anteriormente citado*) y en relación al precursor de 2H7.v16. La combinación de los tres cambios de Ala en la región Fc de v.31 se describe como "Fc110". Las variantes de IgG se muestran con mutaciones con respecto al fondo de 2H7.v16. La unión relativa se expresa como la concentración de la quimera de 2H7.v6.8 sobre la concentración de la variante requerida para la unión equivalente; por tanto, una relación <1 indica una afinidad más débil por la variante. Desviación estándar en la determinación de la afinidad relativa promedió +/- 10 %.

Versión 2H7	Fc Sustituciones*	Unión relativa
6,8	-	-1-
16	-	0,65
31	S298A, E333A, K334A	0,62

Ejemplo 6

Variantes de 2H7 humanizadas con estabilidad potenciada

Para el desarrollo como proteínas terapéuticas, es deseable seleccionar variantes que sigan siendo estables con respecto a la oxidación, la desaminación, u otros procesos que puedan afectar la calidad del producto, en un tampón de formulación adecuado. En 2H7.v16, se identificaron algunos restos como fuentes posibles de inestabilidad: VL (M32) y VH (M34, N100). Por lo tanto, se introdujeron mutaciones en estos sitios para su comparación con v16.

Tabla 8. Unión relativa de las variantes de 2H7 diseñadas para la estabilidad potenciada y/o la función efectora, a CD20 en un ensayo de tipo celular (WIL2-S). Las variantes de IgG se muestran con mutaciones con respecto al fondo de 2H7.v16. La unión relativa se expresa como la concentración de la quimera de 2H7.v6.8 sobre la concentración de la variante requerida para la unión equivalente; por tanto, una relación <1 indica una afinidad más débil por la variante. Desviación estándar en la determinación de la afinidad relativa promedió +/-10 %. Las sustituciones del marco en los dominios variables son relativas a 2H7.v16 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat y las mutaciones Fc (*) se indican mediante la numeración de la UE (Kabat et al., *anteriormente citado*). (**) Variantes que se evaluaron usando 2H7.v16 como el comparador normalizado; los valores relativos se normalizan al de la quimera.

Se combinaron las mutaciones de Fc adicionales con las mutaciones de potenciación de la estabilidad o la afinidad para alterar o potenciar las funciones efectoras basándose en las mutaciones notificadas anteriormente (Idusogie et al. (2000); Idusogie et al. (2001); Shields et al. (2001)). Estos cambios incluyen S298, E333A, K334A como se describe en el Ejemplo 5; K322A para reducir la actividad de CDC; D265A para reducir la actividad de ADCC; K326A o K326W para potenciar la actividad de CDC; y E356D/M358L para probar los efectos de los cambios alotípicos en la región Fc. Ninguna de estas mutaciones produjo diferencias significativas en la afinidad de unión a CD20.				
Versión 2H7	Cambios en la cadena pesada (V _H)	Cambios en la cadena ligera (V _L)	Cambios de Fc *	Unión relativa

6,8	(quimera)	(quimera)	-	-1-
16	-	-	-	0,65
62	-	M32I	-	0,46
63	M34I	-	-	0,49
64	N100A	-	-	
65	N100A	L47W	-	0,74
66	S99A	L47W	-	0,62
67	N54A	-	-	
68	-	M32I	-	0,48
69	-	M32L	-	0,52
70	N100A	-	S298A, E333A, K334A	0,80
71	N100D	-	S298A, E333A, K334A	0,44
72	N100A	M32I	-	0,58
73	N100A	M32L	-	0,53
74	N100A	M32I	S298A, E333A, K334A	0,61
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A	0,60
113	-	-	E356D, M358L	0,60**
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A	1,2**
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L	1,4**
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A	1,2**
134	D56A, N100A	M32L, S92A	E356D, M358L, D265A	1,5**
135	D56A, N100A	M32L, S92A	E356D, M358L, D265A, K326W	0,95**
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A	1,2**
139	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, E356N, M358L	1,1**
154	-	-	D265A	0,70**
155	-	-	S298A, K322A, K334A	0,70**
(**) Variantes que se midieron con 2H7.v16 como comparador; los valores de unión relativa se normalizaron a los de la quimera.				

5 Para probar los efectos de las mutaciones de estabilidad sobre la velocidad de degradación de la proteína, se formularon 2H7.v16 y 2H7.v73 a los 12-14 mg/ml en histidina 10 mM, sacarosa al 6 %, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 5,8 y se incubaron a 40°C durante 16 días. A continuación, se evaluaron las muestras incubadas para determinar los cambios en las variantes de carga mediante cromatografía de intercambio iónico, agregación y fragmentación mediante cromatografía de exclusión por tamaño, y unión relativa mediante un ensayo de tipo celular (WIL2-S).

10 Los resultados (Fig. 9) muestran que 2H7 v.73 tenía mayor estabilidad en comparación con 2H7v.16 con respecto a las pérdidas en la fracción del pico principal mediante cromatografía de intercambio iónico en condiciones de estabilidad acelerada. No se observaron diferencias significativas con respecto a la agregación, fragmentación, o afinidad de unión.

Ejemplo 7

15 Análisis Scatchard de la unión de anticuerpo a CD20 en células WIL2-S

20 Se determinaron las constantes de disociación del equilibrio (K_d) para las variantes de IgG de 2H7 en unión a células WIL2-S usando IgG de 2H7 radiomarcada. Las variantes de IgG se produjeron en células CHO. Rituxan® (la fuente de todos los experimentos es Genentech, S. San Francisco, CA) y 2H7 de murino (BD PharMingen, San Diego, CA) se usaron para comparación con las variantes humanizadas. El anticuerpo 2H7 de murino está también disponible de otras fuentes, por ejemplo, eBioscience, y Calbiochem (ambas de San Diego, CA), Accurate Chemical & Scientific

Corp., (Westbury, NY), Ansell (Bayport, MN), y Vinci-Biochem (Vinci, Italia). Todas las diluciones se llevaron a cabo en un tampón de ensayo de la unión (medio DMEM conteniendo 1 % de albúmina de suero bovino, HEPES 25 mM pH 7,2 y azida de sodio al 0,01 %). Se dispensaron alícuotas (0,025 ml) de ¹²⁵I-2H7.v16 (yodado con lactoperoxidasa) a una concentración de 0,8 nM a los pocillos de una placa de microensayo de 96 pocillos de fondo en V, y se añadieron y mezclaron diluciones en serie (0,05 ml) de anticuerpo frío. A continuación se añadieron células WEIL2-S (60.000 células en 0,025 ml). La placa se precintó y se incubó a temperatura ambiente durante 24 h, a continuación se centrifugó durante 15 min a 3500 RPM. A continuación se aspiró el sobrenadante y el aglomerado celular se lavó y centrifugó. El sobrenadante se aspiró de nuevo, y los aglomerados se disolvieron en NaOH 1 N y se transfirieron a tubos para el recuento gamma. Se utilizaron los datos para el análisis Scatchard (Munson y Rodbard, Anal. Biochem. 107:220-239 (1980)) usando el programa Ligand (McPherson, Comput. Programs Biomed. 17: 107-114 (1983)). Los resultados, mostrados en la Tabla 9, indican que las variantes de 2H7 humanizadas tenían una afinidad de unión a CD20 similar en comparación a 2H7 de murino, y afinidad de unión similar a Rituxan®. Se espera que 2H7.v31 tendrá una K_d muy similar a v.16 sobre la base de la unión que se muestra en la Tabla 7 anterior.

Tabla 9. Afinidad de unión en el equilibrio de variantes de 2H7 según el análisis Scatchard

Variante de anticuerpo	Kd (nM)	n
Rituxan	0,99±0,49	3
2H7 (murino)	1,23±0,29	3
2H7.v16	0,84±0,37	4
2H7.v73	1,22 60:39	4
2H7.v75	1,09±0,17	4

Ejemplo 8

20 Ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Se evaluaron variantes de IgG de 2H7 por su capacidad de mediar en la lisis dependiente del complemento de células WIL2-S, una línea de células B linfoblastoide que expresa CD20, esencialmente como se describe (Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000); Idusogie et al., J. Immunol. 166:2571-2575 (2001)). Los anticuerpos se diluyeron en serie 1:3 a partir de una solución madre de 0,1 mg/ml. Se añadió una alícuota de 0,05 ml de cada dilución a una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos que contenía 0,05 ml de una solución del complemento humano normal (Quidel, San Diego, CA) A esta mezcla, se añadieron 50.000 células WIL2-S en un volumen de 0,05 ml. Tras la incubación durante 2 h a 37 °C, se añadieron 0,05 ml de una solución de Alamar blue (Accumed International, Westlake, OH), y se continuó la incubación durante 18 h más a 37 °C. A continuación se eliminaron las tapas de las placas, y se agitaron durante 15 min a temperatura ambiente sobre un agitador orbital. Se leyeron las unidades de fluorescencia relativa (UFR) utilizando un filtro de excitación a 530 nm y un filtro de emisión a 590 nm. Se calculó una CE₅₀ ajustando las UFR como función de la concentración para cada anticuerpo utilizando el programa informático KaleidaGraph.

Los resultados (Tabla 10) muestran una sorprendente mejora en la CDC por los anticuerpos 2H7 humanizados, con una potencia relativa similar a Rituxan® para v.73, 3 veces más potente que Rituxan® para v.75 y 3 veces más débil que Rituxan® para v. 16.

Tabla 10. Actividad CDC de los anticuerpos 2H7 en comparación con Rituxan. Los números > 1 indican una actividad de CDC menos potente que Rituxan® y los números <1 indican una actividad más potente que Rituxan®. Los anticuerpos se produjeron a partir de líneas CHO estables, salvo los indicados por (*). que se produjeron transitoriamente.

Variante de anticuerpo	n	CE ₅₀ (variante)/CE ₅₀ (Rituxan)
Rituxan®	4	-1-
2H7.v16	4	3,72; 4,08
2H7.v31*	4	2,21
2H7.v73	4	1,05
2H7.v75	4	0,33
2H7.v96*	4	0,956
2H7.v114*	4	0,378
2H7.v115*	4	0,475
2H7.v116*	1	>100
2H7.v135*	2	0,42

Ejemplo 9**Ensayos de citotoxicidad dependiente del Anticuerpo (ADCC)**

- 5 Se evaluaron variantes de IgG de 2H7 por su capacidad de mediar en la lisis de las células WIL2-S por los linfocitos citolíticos naturales (linfocitos NK), una línea de células B linfoblastoide que expresa CD20, esencialmente como se ha descrito (Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001)) usando una lectura de lactato deshidrogenasa (LDH). Los linfocitos NK se prepararon a partir de 100 ml de sangre heparinizada, diluida con 100 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato), obtenida de donantes humanos normales que se habían isotipado para FcγRIII, conocido también como CD16 (Koene et al., Blood 90:1109-1114 (1997)). En este experimento, los linfocitos NK eran de donantes humanos heterocigóticos para CD16 (F158/V158). La sangre diluida se distribuyó en capas sobre 15 ml de medio de separación de linfocitos (ICN Biochemical, Aurora, Ohio) y se centrifugó durante 20 min a 2000 RPM. Los glóbulos blancos de la interfase entre capas se dispensaron a 4 tubos limpios de 50 ml, que se llenaron con medio RPMI que contenía suero de feto de ternera al 15 %. Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 1400 RPM y se descartó el sobrenadante. Los aglomerados se volvieron a suspender en tampón MACS (BSA al 0,5 %, EDTA 2 mM) y los linfocitos NK se purificaron usando perlas (kit de aislamiento de linfocitos NK, 130-046-502) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotech). Los linfocitos NK se diluyeron en tampón MACS a 2×10^6 células/ml.
- 20 Se añadieron las diluciones en serie de anticuerpo (0,05 ml) en medio de ensayo (F12/DMEM 50:50 sin glicina, tampón HEPES 1 mM pH 7,2, penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml; Gibco), glutamina y suero de feto bovino inactivado térmicamente al 1 %) a una placa de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos. Las células WIL2-S se diluyeron en tampón de ensayo hasta una concentración de 4×10^5 células/ml. Las células WIL2-S (0,05 ml por pocillo) se mezclaron con anticuerpo diluido en la placa de 96 pocillos y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente para permitir la unión del anticuerpo a CD20 (opsonización).

La reacción ADCC se inició añadiendo 0,1 ml de linfocitos NK a cada pocillo. En los pocillos del control, se añadió Triton X-100 al 2 %. A continuación se incubó la placa durante 4 h a 37 °C. Se midieron los niveles de LDH liberada utilizando un kit de detección de la citotoxicidad (LDH) (kit n.º 1644793, Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se añadieron 0,1 ml del revelador de LDH a cada pocillo, seguido por mezclado durante 10s. A continuación se cubrió la placa con una hoja de aluminio y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación se leyó la densidad óptica a 490 nm que se usó para calcular el % de lisis dividiendo por la LDH total medida en los pocillos del control. La lisis se representó gráficamente en función de la concentración de anticuerpo, y se usó un ajuste de la curva de 4 parámetros (KaleidaGraph) para determinar las concentraciones de la CE₅₀.

Los resultados mostraron que los anticuerpos 2H7 humanizados fueron activos en la ADCC, con una potencia relativa 20 veces mayor que Rituxan® para v.31 y v.75, 5 veces más potente que Rituxan® para v.16, y casi 4 veces mayor que Rituxan® para v.73.

40 **Tabla 11.** Actividad ADCC de los anticuerpos 2H7 respecto a células WIL2-S en comparación con 2H7.v16, basándose en n experimentos. (Los valores >1 indican una potencia menor que 2H7.v16 y los valores <1 indican mayor potencia.)

Variante de anticuerpo	n	CE ₅₀ (variante)/CE ₅₀ (2H7.v16)
Rituxan®	4	5,3
2H7.v16	5	1
2H7.v31	1	0,24
2H7.v73	5	1,4
2H7.v75	4	0,25

45 Se llevaron a cabo ensayos adicionales de ADCC para comparar las variantes combinadas de 2H7 con Rituxan®. Los resultados de estos ensayos indicaron que 2H7.v114 y 2H7.v115 tienen una potencia mejorada >10 veces en comparación con Rituxan® (Tabla 12).

50 **Tabla 12.** Actividad ADCC de los anticuerpos 2H7 respecto a células WIL2-S en comparación con Rituxan®, basándose en n experimentos (Los valores >1 indican una menor potencia que Rituxan®, y los valores <1 indican mayor potencia).

Variante de anticuerpo	n	CE50(variante)/CE50(Rituxan)
Rituxan®	2	-1-
2H7 v.16	2	0,52
2H7 v.96	2	0,58
2H7.v114	2	0,093
2H7.v115	2	0,083
2H7.v116	2	0,30

Ejemplo 10**Efectos in vivo de variantes 2H7 en un estudio piloto en macacos**

- 5 Variantes de 2H7, producidas por transfección transitoria de células CHO, se sometieron a ensayo en macacos macho normales (*Macaca fascicularis*) a fin de evaluar sus actividades *in vivo*. Otros anticuerpos dirigidos contra CD20, tales como C2B8 (Rituxan®) han demostrado capacidad de agotar las células B en primates normales (Reff et al., Blood 83: 435-445 (1994)).
- 10 En un estudio, se compararon las variantes de 2H7 humanizadas. En un estudio paralelo, también se sometió a ensayo Rituxan® en macacos. Se usaron cuatro monos en cada uno de cinco grupos de dosis: (1) vehículo, (2) 0,05 mg/kg de hu2H7.v16, (3) 10 mg/kg de hu2H7.v16, (4) 0,05 mg/kg de hu2H7.v31, y (5) 10 mg/kg de hu2H7.v31. Se administraron los anticuerpos por vía intravenosa a una concentración de 0, 0,2 o 20 mg/ml, para un total de dos dosis, una en el día 1 del estudio y otra en el día 8. El primer día de la dosificación se designó día 1 y el día anterior se designó día -1; el primer día de la recuperación (para 2 animales en cada grupo) se designó como día 11. Se
- 15 extrajeron muestras de sangre en los días -19, -12, 1 (antes de la dosificación), y a las 6 h, 24 h y 72 h tras la primera dosis. Se tomaron muestras adicionales en el día 8 (antes de la dosificación), día 10 (antes del sacrificio de 2 animales/grupo), y en los días 36 y 67 (para los animales recuperados).
- 20 Se determinaron las concentraciones de células B periféricas mediante un método FACS que hizo el recuento de células CD3-/CD40+. Se obtuvieron los porcentajes de células B CD3-CD40+ de los linfocitos totales en muestras de mono mediante la siguiente estrategia de clasificación. Se marcó la población de linfocitos en el diagrama de dispersión del dispersor delantero/dispersor lateral para definir la Región 1 (R1). Utilizando los casos de R1, se trazaron las gráficas de puntos de la intensidad de la fluorescencia de los marcadores CD40 y CD3. Se usaron los
- 25 controles de los isotipos marcados fluorescentemente para determinar los respectivos puntos de corte para la positividad a CD40 y CD3.

Los resultados indicaron que 2H7.v16 y 2H7.v31 fueron capaces de producir el agotamiento total de las células B periféricas a la dosis de 10 mg/kg y el agotamiento parcial de las células B periféricas a la dosis de 0,05 mg/kg (Fig. 11). El curso temporal y la extensión del agotamiento de las células B medidos durante las primeras 72 h de la dosificación fueron similares para los dos anticuerpos. El posterior análisis de los animales en recuperación indicó que los animales tratados con 2H7.v31 mostraron un agotamiento prolongado de las células B en comparación con aquellos a los que se dosificó con 2H7.v16. En particular, los animales en recuperación tratados con 10 mg/kg de 2H7.v16, las células B mostraron una sustancial recuperación de células B en algún momento entre el muestreo del

30 Día 10 y del Día 36. Sin embargo, para los animales en recuperación tratados con 10 mg/kg de 2H7.v31, las células B no muestran recuperación hasta algún momento entre el Día 36 y el Día 67 (Fig. 11). Esto sugiere una mayor duración del agotamiento completo en aproximadamente un mes para 2H7.v31 en comparación a 2H7.v16.

No se observó toxicidad en el estudio de monos a una dosis baja o alta y la patología grosera fue normal. En otros estudios, v16 se toleró bien hasta la dosis más elevada evaluada (100mg/kgx2 = 1200 mg/m²x2) tras la administración i.v. de 2 dosis administradas con 2 semanas de separación es estos monos.

40

Los datos en los macacos con 2H7.v16 frente a Rituxan® sugieren que una reducción de 5 veces en la actividad de CDC no afecta adversamente la potencia. Un anticuerpo con una actividad ADCC potente pero con una actividad CDC reducida puede tener un perfil de seguridad más favorable con respecto a las primeras reacciones de infusión que uno con mayor actividad de CDC.

45

Ejemplo 11**50 Anticuerpos variantes 2H7 deficientes en fucosa con función efectora potenciada**

Células CHO y HEK293 normales añaden fucosa al oligosacárido IgG hasta un alto grado (97-98 %). la IgG sérica también queda fuertemente fucosilada.

- 55 DP12, una línea de células CHO dihidrofolato reductasa menos (DHFR⁻) que es competente para fucosilación, y Lec13, una línea celular que es deficiente en fucosilación de proteínas se usaron para producir los anticuerpos de este estudio. La línea de células CHO Pro-Lec13.6a (Lec13) se obtuvo de la Profesora Pamela Stanley del Albert Einstein College of Medicine de la Universidad de Yeshiva. Las líneas precursoras son Pro-(prolina auxótrofas) y Gat-(glicina, adenosina, timidina auxótrofas). La línea de células CHO-DP12 es un derivado de línea celular CHO-K1 (ATCC n.º CCL-61), que es deficiente en dihidrofolato reductasa, y tiene una menor necesidad de insulina. Las
- 60 líneas celulares se transfectaron con ADNc utilizando el método Superfect (Qiagen, Valencia, CA). La selección de las células Lec13 que expresan los anticuerpos transfectados se realizó usando diclorhidrato de puromicina (Calbiochem, San Diego, CA) a 10 µg/ml en medio de crecimiento que contenía: medio MEM Alpha con L-glutamina, ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), suplementado con FBS al 10 %
- 65 inactivado (GIBCO), HEPES 10 mM, y 1X penicilina/estreptomina (GIBCO). Las células CHO se seleccionaron de una forma análoga en medio de crecimiento que contiene F12 de Ham sin GHT: DMEM bajo en glucosa sin glicina

con NaHCO₃ suplementado con FBS al 5 % (GIBCO), HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM, 1X GHT(glicina, hipoxantina, timidina), y 1X de penicilina/estreptomicina.

Las colonias se formaron durante dos o tres semanas y se combinaron para su expansión y expresión de proteínas. Los combinados celulares se sembraron inicialmente a 3×10^6 células/placa de 10 cm para la expresión de proteínas en lotes pequeños. Las células se convirtieron en medio exento de suero una vez que crecieron al 90-95 % de confluencia y después de 3-5 días, los sobrenadantes de las células se recogieron y se sometieron a ensayo en un ELISA de IgG Fc y de IgG intacta para estimar los niveles de expresión de proteínas. Las células Lec13 y CHO se sembraron a aproximadamente 8×10^6 células/placa de 15 cm el día antes de pasar al medio de producción PS24, suplementado con 10 mg/l de insulina recombinante humana y 1 mg/l de elementos traza.

Las células Lec13 y las células DP12 permanecieron en medio de producción exento de suero durante 3-5 días. Los sobrenadantes se recogieron y se clarificaron mediante centrifugación en tubos cónicos de 150 ml para eliminar células y residuos. Se añadieron inhibidores de la proteasa PMSF y aprotinina (Sigma, St. Louis, MO) y los sobrenadantes se concentraron 5 veces en células en agitación usando filtros MWCO30 (Amicon, Beverly, MA) antes de su purificación inmediata usando cromatografía con proteína G (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Todas las proteínas se intercambiaron con tampón en solución salina tamponada con fosfato (PBS) usando concentradores Centriprep-30 (Amicon) y se analizó por electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida. Las concentraciones de proteína se determinaron usando A280 y se verificaron usando análisis de la composición de aminoácidos.

Las células CHO se transfectaron con vectores que expresaban 2H7v16 y 2H7v.31 humanizados, y se seleccionan como se ha descrito. El anticuerpo 2H7v.16 retiene la región Fc natural, mientras que v.31 (véase el Ejemplo 5, Tabla 7 anterior) tiene una región Fc en la que se realizaron 3 cambios de aminoácidos (S298A, E333A, K334A) que dan como resultado una mayor afinidad por el receptor de FcγRIIIa (Shields et al. J. Biol. Chem. 276 (9):6591-6604 (2001)). Después de la transfección y la selección, las colonias individuales de células se aislaron y se evaluaron para determinar el nivel de la expresión de proteínas y los mayores productores se sometieron a selección con metotrexato para seleccionar las células que habían amplificado el número de copias del plásmido y que producían, por tanto, los niveles más altos del anticuerpo. Las células se hicieron crecer, se transfirieron a medio exento de suero durante un período de un 7 días, a continuación el medio se recogió, se cargó en una columna de proteína A, y el anticuerpo se eluyó usando las técnicas habituales. La concentración final del anticuerpo se determinó usando un Blisa que mide el anticuerpo intacto. Todas las proteínas se intercambiaron con tampón en solución salina tamponada con fosfato (PBS) usando concentradores Centriprep-30. (Amicon) y se analizaron por electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida.

Análisis mediante espectrometría de masas con desorción/ionización con láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI-TOF) de los oligosacáridos unidos a asparagina: Los oligosacáridos unidos a N se liberaron de las glicoproteínas recombinantes mediante el procedimiento de Papac et al., Glycobiology 8,445-454 (1998). En resumen, los pocillos de una placa de microtitulación revestida con PVDF de 96 pocillos (Millipore, Bedford, MA) se acondicionaron con 100 µl de metanol que se pasó por las membranas de PVDF aplicando vacío al colector de vacío Millipore Multiscreen. Las membranas de PVDF acondicionadas se lavó con 3 X 250 µl de agua. Entre todas las etapas de lavado, los pocillos se drenaron completamente aplicando un suave vacío al colector. Las membranas se lavaron con tampón de reducción y carboximetilación (RCM) consistente en clorhidrato de guanidina 6 M, Tris 360 mM, EDTA 2 mM, pH 8,6. Las muestras de glicoproteína (50 µg) se aplicaron a los pocillos individuales, se volvieron a hacer pasar por las membranas PVDF con un suave vacío y los pocillos se lavaron con 2 X 50 µl de tampón RCM. Las muestras inmovilizadas se redujeron añadiendo 50 µl de una solución de ditiotreitól (TdT) 0,1 M a cada pocillo e incubando la placa de microtitulación a 37°C durante 1 h. El DTT se eliminó al vacío, y los pocillos se lavaron con 4 x 250 µl de agua. Los restos cisteína se carboximetilaron mediante la adición de 50 µl de una solución de ácido yodoacético (IAA) 0,1 M que se preparó recientemente en NaOH 1 M y se diluyó hasta 0,1 M en tampón RCM. La carboximetilación se llevó a cabo mediante incubación durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se aplicó vacío a la placa para eliminar la solución de IAA y los pocillos se lavaron con 4 x 250 µl de agua purificada. Las membranas de PVDF se bloquearon mediante la adición de 100 µl de una solución de PVP360 (polivinilpirrolidona 360.000 MW) (Sigma) al 1 % e incubación durante 1 h a temperatura ambiente. La solución de PVP-360 se eliminó al vacío, y los pocillos se lavaron con 4 x 250 µl de agua. La solución de digestión PNGase F (New England Biolabs, Beverly, MA), 25 µl de una solución de 25 Unidades/ml en Tris acetato 10 mM, pH 8,4, se añadió a cada pocillo, y la digestión continuó durante 3 h a 37°C. Tras la digestión, las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf de 500 µl y se añadieron a cada pocillo 2,5 µl de una solución de ácido acético 1,5 M. Las muestras acidificadas se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente para convertir los oligosacáridos de glicosilaminas a su forma de hidroxilo. Antes del análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF, los oligosacáridos liberados se desalaron usando un lecho de 0,7 ml de una resina de intercambio catiónico (resina AGSOW-X8 en forma de hidrógeno) (Bio-Rad, Hercules, CA) en suspensión compactada en tubos de reacción (US Biochemical, Cleveland, OH).

Para el análisis por espectrometría de masas de las muestras en el modo positivo, los oligosacáridos desalados (alícuotas de 0,5 µl) se aplicaron a las dianas de acero inoxidable con 0,5 µl de la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (sDHB) que se preparó disolviendo 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico con 0,1 mg de ácido 5-

metoxisilíclico en 1 ml de etanol/cloruro sódico 10 mM 1:1 (v/v). La mezcla muestra/matriz se secó al vacío. Para el análisis en el modo negativo, los oligosacáridos unidos a N desalados (alícuotas de 0,5 µl) se aplicaron a la diana de acero inoxidable junto con 0,5 µl de matriz de 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (THAP) preparada en acetonitrilo 3,3 mM en tampón citrato de amonio 1:3 (v/v). La mezcla muestra/matriz se secó al vacío y se dejó que absorbiera la humedad atmosférica antes del análisis. Los oligosacáridos liberados se analizaron mediante MALDI-TOF en un espectrómetro de masas PerSeptive BioSystems Voyager-DE. El espectrómetro de masas funcionó a 20 kV tanto en modo positivo como en modo negativo con la configuración lineal, y usando la extracción retardada. Los datos se adquirieron con una potencia láser de 1300 y en el modo de sumatorio de datos (240 barridos) para mejorar la relación entre señal y ruido. El instrumento se calibró usando una mezcla de patrones de oligosacáridos, y los datos se suavizaron usando el algoritmo de 19 puntos de Savitsky-Golay antes de asignar las masas. La integración de los datos de los espectros de masas se consiguió usando el paquete informático de análisis de datos Caesar 7.0 (SciBridge Software).

Ensayos de celular dependiente anticuerpo de linfocitos citolíticos naturales (NK).

Los ensayos ADCC se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 9. La proporción entre NK y célula diana (WIL2-S) fue 4 a 1, los ensayos se realizaron durante 4 horas, y la toxicidad se midió como antes usando el ensayo de la lactosa deshidrogenasa. Las células diana se opsonizaron con las concentraciones de anticuerpo indicadas para 30 min antes de la adición de linfocitos NK. El anticuerpo Rituxan® usado pertenecía a Genentech (S. San Francisco, CA). La Figura 12 muestra los resultados de un ensayo ADCC representativo.

Los resultados muestran que los anticuerpos poco fucosilados median la destrucción de las células diana mediadas por los linfocitos NK de forma más eficaz de los que lo hacen los anticuerpos con un complemento completo de fucosa. El anticuerpo poco fucosilado, 2H7v.31, es el más eficaz para mediar en la destrucción de las células diana. Este anticuerpo es eficaz a concentraciones más bajas y es capaz de mediar en la destrucción de un mayor porcentaje de células diana a mayores concentraciones de lo que lo hacen otros anticuerpos. La actividad de los anticuerpos es la siguiente: 2H7 v31 derivado de Lec13 > 2H7v16 derivado de Lec13 > 2H7v31 derivado de Dip12 > 2H7v16 derivado de Dip12 > o = a Rituxan. Las alteraciones en la proteína y los carbohidratos son aditivas. La comparación entre el carbohidrato encontrado en la IgG natural y la IgG producida en Lec13 y producida en CHO no mostró diferencias apreciables en la extensión de la galactosilación y, por tanto, los resultados se pueden atribuir solamente a la presencia o ausencia de fucosa.

Ejemplo 12

Anticuerpos variantes 2H7 deficientes en fucosa con ADCC potenciada in vivo

Este ejemplo describe la actividad ADCC in vivo de las variantes 2H7 humanizadas deficientes en fucosa incluyendo los v.16 y v.31 producidas en Lec13 comparados con sus homólogos fucosilados normales producidos en DP12, en ratones que expresan CD16 [FcγRIII] humano y CD20 humano.

Generación de ratones huCD20Tg⁺ huCD16Tg⁺ mCD16^{-/-}

Se generaron ratones transgénicos con CD20 humano a partir de ADN BAC CD20 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los ratones se criaron basándose en el análisis FACS de la expresión de CD20 humano. Los ratones HuCD20 Tg⁺ se cruzaron a continuación con ratones huCD16Tg+mCD16^{-/-} para generar ratones huCD20Tg+huCD16Tg+mCD16^{-/-}.

Tratamiento in vivo

De diez a 100 µg de cada una de las variantes 2H7 o Rituxan® se administraron a los ratones huCD20Tg+huCD16Tg+mCD16^{-/-} mediante inyecciones intraperitoneales. Se aplicaron cantidades iguales de anticuerpos emparejados por isotipo de una forma similar al grupo control negativo de los animales.

Preparación de los linfocitos de ratón

Los linfocitos de ratón procedentes de sangre completa, bazo, ganglios linfáticos y médula ósea se prepararon según el protocolo normalizado descrito en "Current Protocols in Immunology, editado por John Coligan, Ada Kruisbeek, David Margulies, Ethan Shevach y Warren Strober, 1994".

Análisis FACS

Medio millón de células se lavaron y se resuspendieron en 100 µl de tampón FACS, que es solución salina tamponada con fosfato con BSA al 1 %, que contiene 5 µl de anticuerpo de tinción o de control. Todos los anticuerpos de tinción, incluidos los controles de isotipo, se obtuvieron de PharMingen, San Diego, CA. La expresión de CD20 humano se evaluó mediante tinción con Rituxan® junto con el anticuerpo secundario dirigido contra IgG1 humana conjugado con FITC. El análisis FACS se realizó usando un FACScan y Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Todos los linfocitos se definieron mediante dispersión de luz hacia

adelante y lateral, mientras que todos los linfocitos B se definen con la expresión de B220 sobre la superficie celular.

El agotamiento y la recuperación de las células B se evaluó analizando los recuentos de células B periféricas y el análisis de células B de hCD20+ B mediante FACS en el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea diariamente durante la primera semana después de la inyección y posteriormente de forma semanal. Se realizó un seguimiento de los niveles séricos del anticuerpo variante 2H7 inyectado.

Los resultados de este ensayo *in vivo* confirman los hallazgos *in vitro* de la actividad ADCC aumentada, y un mayor agotamiento de células de las variantes 2H7 deficientes en fucosa en comparación con sus análogos de glicosilación natural (con respecto a la fucosilación).

Ejemplo 13

Actividad de apoptosis

Los anticuerpos dirigidos contra CD20 incluyendo Rituxan® han demostrado inducir *apoptosis in vitro* cuando se reticulan mediante un anticuerpo secundario o por medios químicos (Shan et al., Blood 9:1644-1652 (1998); Byrd et al., Blood 99:1038-43 (2002); Pederson et al., Blood 99:1314-19 (2002)). Cuando se reticulan químicamente, los dímeros 2H7 de murino indujeron apoptosis de células Daudi (Ghetie et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:7509-14 (1997)). La reticulación con un anticuerpo secundario también indujo la apoptosis con el anticuerpo murino 2H7 (Shan et al., 1998). Se cree que estas actividades son fisiológicamente relevantes porque varios mecanismos podrían dar lugar a la reticulación de los anticuerpos dirigidos contra CD20 unidos al CD20 de la superficie celular *in vivo*.

RhuMAb 2H7.v16 [2H7 v16 humanizado; RhuMAb significa anticuerpo monoclonal humano recombinante] y Rituxan® se compararon en ensayos de apoptosis *in vitro* usando un anticuerpo secundario para reticulación. Células Ramos (CRL-1596, ATCC, Manassas, VA), una línea celular de linfocitos B humanos que expresan CD20, se usaron para medir la capacidad de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD20 rhuMAb 2H7.v16 y Rituximab frente a un anticuerpo de control negativo, Trastuzumab (Herceptin®, Genentech, South San Francisco, CA), para inducir la apoptosis medida por tinción con Anexina V y exclusión del colorante yoduro de propidio (Vybrant® Apoptosis Assay Kit, Molecular Probes, Seattle, WA). Las células Ramos se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco, Rockville, MD) que contenía suero de feto de ternera al 10 % (Biosource International, Camarillo, CA) y L-glutamina 2 mM (Gibco). Antes del ensayo, las células se lavaron dos veces en medio reciente y a continuación se ajustó a una concentración de células de 2×10^6 por ml. Las células (150 μ l) se añadieron a placas de ensayo de 96 pocillos (Becton Dickinson, Palo Alto, CA) que contenían 150 μ l de una cantidad predeterminada de IgG1 de control, rhuMAb 2H7.v16, o Rituximab, junto con F(ab)'2 de cabra dirigido contra Fc humano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Las concentraciones finales de IgG fueron 100, 10, 1,0, 0,1, 0,01 y 0,001 nM, y la concentración del F(ab)'2 de cabra dirigido contra Fc humano se ajustó a dos veces la concentración del anticuerpo de la muestra respectiva. Cada dilución se realizó por triplicado. Después de una incubación de 24 horas a 37°, las células se lavaron dos veces con PBS y a continuación se tiñeron con Anexina V y yoduro de propidio según las recomendaciones del fabricante. Los patrones de tinción de las células Ramos se analizaron mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA), y los datos se recogieron en periodos de 10 s. Los datos se redujeron usando el programa informático Cellquest Pro (Becton Dickinson). Las células Ramos con resultado positivo para (1) la tinción con Anexina V, (2) tinción doble con Anexina V y yoduro de propidio, y (3) el número de células vivas no teñidas, se contaron y se representaron gráficamente usando el programa informático KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA).

Tanto rhuMAb 2H7.v16 como Rituximab indujeron apoptosis de las células Ramos cuando se reticularon con anticuerpo dirigido contra Fc humano y en comparación con el anticuerpo de control IgG1 irrelevante (Figuras 13-15). La actividad apoptótica de (rhuMAb 2H7) fue ligeramente inferior a la de Rituximab. A concentraciones 10 nM de los anticuerpos reticulados rhuMAb 2H7, Rituximab, e IgG1 de control, las fracciones de células teñidas con Anexina V fueron 18,5, 16,5, 2,5 %, respectivamente, las fracciones de células con marca doble fueron de 29, 38, y 16 %, y el número de células vivas contadas durante 10 s fueron 5200, 3100 y 8600.

Estos datos *in vitro* demuestran que la apoptosis es un posible mecanismo para el agotamiento de células B *in vivo*. La reticulación *in vivo* de rhuMAb 2H7 o Rituximab unido al CD20 de la superficie celular se puede producir a través de Fc γ R sobre las superficies de las células efectoras inmunitarias.

Ejemplo 14

Supresión *in vivo* del crecimiento tumoral

La capacidad de rhuMAb 2H7.v16 para inhibir el crecimiento de células B Raji humanas, una línea celular de linfoma (ATCC CCL 86), se evaluó en ratones Balb/c lampiños (atímicos). Las células Raji expresan CD20, y se ha notificado que crecen en ratones lampiños, produciendo enfermedad metastásica; el crecimiento tumoral se inhibe mediante Rituxan® (Clynes et al., Nature Medicine 6,443-446 (2000)). Cincuenta y seis ratones lampiños Balb/c de 8-10 semanas de edad se dividieron en 7 grupos (A-G), consistiendo cada grupo en 8 ratones. El día 0, cada ratón

recibió una inyección subcutánea de 5×10^6 células de linfoma B Raji en el costado. A partir del día 0, cada ratón recibió bien 100 μ l de solución del control negativo (PBS; suero salino tamponado con fosfato), Rituxan® o 2H7.v16. La dosis dependió del peso, y la administración del fármaco fue por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los ratones del grupo A recibieron PBS. Los grupos B-D recibieron Rituxan® a 5,0, mg/kg, 0,5 mg/kg, y 0,05 mg/kg respectivamente. Los ratones de los grupos E-G recibieron 2H7 v.16 a 5,0 mg/kg, 0,5 mg/kg, y 0,05 mg/kg respectivamente. Las inyecciones se repitieron cada semana durante 6 semanas. En intervalos semanales durante el tratamiento, cada ratón se inspeccionó para determinar la presencia de tumores palpables en el lugar de la inyección y el volumen de los tumores, si había, se midió y se registró. Se realizó una inspección final en la semana 8 (después de un intervalo de dos semanas sin tratamientos).

Los resultados de este estudio mostraron que tanto rhuMAb 2H7.v16 como Rituxan® fueron eficaces para inhibir el crecimiento de tumores de células Raji subcutáneos en ratones lampiños (Figs. 16-18). Se observó crecimiento tumoral en el grupo del control de PBS a partir de las 4 semanas. Sin embargo, no se observó crecimiento en los grupos tratados con Rituxan® o 2H7.v16 a 5 mg/kg o 0,5 mg/kg en las 8 semanas de duración del estudio. En los grupos de tratamiento con baja dosis de 0,05 mg/kg, se observaron tumores en un animal del grupo 2H7 y en un animal del grupo Rituxan® (Fig. 18).

Ejemplo 15

Clonación de CD20 de macaco y unión del anticuerpo

La secuencia de ADN de CD20 de macaco (*Macaca fascicularis*) se determinó tras el aislamiento del ADNc que codifica CD20 procedente de una biblioteca de ADNc de bazo de macaco. Un sistema de plásmido SUPERSRIPT™ para la síntesis de ADNc y el clonación del plásmido (n.º de cat. 18248-013, Invitrogen, Carlsbad, CA) se utilizó con ligeras modificaciones para construir la biblioteca. La biblioteca de ADNc se ligó en un vector PRK5e con sitios de restricción Xho I- y Not I. El arNm se aisló del tejido del bazo ((California Regional Research Primate Center, Davis, CA). Los cebadores para amplificar el ADNc que codifica CD20 se diseñaron basándose en las secuencias no codificantes del CD20 humano. La región del extremo N del cebador 5'-AGTTTTGAGAG-CAAAATG-3' y la región del extremo C del cebador 5'-AAGCTATGAACACTAATG-3' se utilizaron para clonación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADNc que codifica el CD20 de macaco. La reacción de la PCR se llevó a cabo la PCR utilizando el Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity de acuerdo con la recomendación del fabricante (Gibco, Rockville, MD). El producto de la PCR se subclonó en el pCR @2.1-TOPO @Vector (Invitrogen) y se transformó en *E. coli* XL-1 blue (Stratagene, La Jolla, CA). El ADN plásmido que contiene los productos de la PCR ligados se aisló de los clones individuales y se secuenció.

La secuencia de aminoácidos de CD20 de macaco se muestra en la Figura 19. La Figura 20 muestra una comparación entre CD20 de macaco y humano. El CD20 de macaco tiene una similitud del 97,3 % con el CD20 humano, con 8 diferencias. El dominio extracelular contiene un cambio en V157A, mientras que los 7 restos restantes se pueden encontrar en las regiones transmembrana o citoplásmica.

Los anticuerpos dirigidos contra el CD20 humano se analizaron para determinar su capacidad para unirse y desplazar el 2H7 murino conjugado con FITC de su unión a las células de macaco que expresan CD20. Se extrajeron veintidós mililitros de sangre de 2 macacos (California Regional Research Primate Center, Davis, CA) en heparina sódica, y se enviaron directamente a Genentech Inc. El mismo día, las muestras de sangre se combinaron y se diluyeron 1:1 mediante la adición de 40 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). 20 ml de la sangre diluida se estratificó en 4 x 20 ml de Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) en tubos cónicos de 50 ml (n.º de cat. 352098, Falcon, Franklin Lakes, NJ) y se centrifugaron a 1300 rpm durante 30 minutos a T.A: en una centrífuga Sorval 7. (Dupont, Newtown, CT). La capa de PBMC se aisló y se lació en PBS. Los eritrocitos se lisaron en una solución de NaCl al 0,2 %, se restauraron a la isotonicidad con un volumen equivalente de una solución de NaCl 1,6 %, y se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 rpm. El aglomerado de PBMC se resuspendió en RPMI 1640 (Gibco, Rockville, MD) que contenía suero de feto bovino al 5 % (FBS) y se dispuso en una placa de cultivo de tejido de 10 cm durante 1 hora a 37° C. Las poblaciones de células B y T no adherentes se eliminaron mediante aspiración, se centrifugaron y se contaron. Se recuperaron un total de $2,4 \times 10^7$ células. Las PBMC resuspendidas se distribuyeron en veinte tubos de cultivo de 12 x 75 mm (n.º de cat. 352053, Falcon), conteniendo cada tubo 1×10^6 células en un volumen de 0,25 ml. Los tubos se dividieron en cuatro conjuntos de cinco tubos. A cada conjunto se añadió bien medio (RPMI1640; 5 % FBS), cantidades tituladas de anticuerpo de control IgG₁ humano, Rituxan®, 2H7.v16, o 2H7.v31, La concentración final de cada anticuerpo fue de 30, 10, 3,3 y 1,1 nM. Además, cada tubo también recibió 20 μ l de anticuerpo dirigido contra CD20 humano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (n.º Cat 555622, BD Biosciences, San Diego, CA). Las células se mezclaron suavemente, se incubaron durante 1 hora sobre hielo, y a continuación se lavaron dos veces en PBS frío. La tinción de la superficial celular se analizó con un Epic XL-MCL (Coulter, Miami, FL), se derivó la media geométrica, se representó gráficamente (KaleidaGraph™, Synergy Software, Reading, PA) frente a las concentraciones de los anticuerpos.

Los datos de la Figura 21 muestran que 2H7 v.16 y 2H7 v.31 desplazaron de forma competitiva la unión de 2H7 murino-FTTG a células de macaco. Además, Rituxan® también desplazó la unión de 2H7 murino-FTTG, demostrando de esta manera que tanto 2H7 como Rituxan® se unen a un epítipo solapante en CD20. Además, los

datos muestran que el valor de CI_{50} para 2H7 v.16, 2H7 v.31 y Rituxan son similares y están comprendidos en el intervalo de 4-6 nM.

Ejemplo 16

5

Estudio en fase I/II de rhuMAb 2H7 (2H7.v16) en artritis reumatoide de moderada a grave Sinopsis del protocolo

10 Estudio aleatorizado y controlado con placebo, multicéntrico, doblemente enmascarado, en fase I/II de la seguridad del aumento de la dosificación de PRO70769 (rhumab 2H7) en pacientes con artritis reumatoide de moderada a grave que recibieron dosis estables de metotrexato concomitante.

Objetivos

15 El objetivo principal de este estudio es evaluar y tolerabilidad del aumento de la dosificación intravenosa (IV) de PRO7076 (rhuMAb 2H7) en sujetos con artritis reumatoide de moderada a grave (AR).

Diseño del estudio

20 Se trata de un ensayo clínico aleatorizado, controlado con placebo, multicéntrico, en fase I/II, con enmascaramiento del investigador y del sujeto, acerca de la seguridad de dosis crecientes de PRO70769 combinado con MTX en sujetos con RA de moderada a grave. El estudio consiste en una fase de aumento de la dosis y una segunda fase con inscripción de un número mayor de sujetos. El Patrocinador permanece sin enmascarar con respecto a la asignación del tratamiento.

25

Se inscribirán sujetos con AR moderada a grave con fracaso en el tratamiento con entre uno y cinco fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad o sustancias biológicas quienes tienen respuestas clínicas insatisfactorias al tratamiento con MTX.

30 Se pedirá a los sujetos que tomen MTX en el intervalo de 10-25 mg semanalmente durante al menos 12 semanas antes de iniciar el estudio, y que sigan con una dosis estable durante al menos 4 semanas tras recibir la dosis inicial del fármaco del estudio (PRO70769 o placebo). Los sujetos también pueden recibir dosis estables de corticosteroides orales (hasta un máximo de 10 mg diarios o equivalentes de prednisona) y dosis estables de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los sujetos recibirán dos infusiones IV de PRO70769 o placebo
35 equivalente en la dosis indicada los Días 1 y 15 según el siguiente plan de aumento de la dosis (véase la Figura 22).

El aumento de dosis se produce de acuerdo con criterios específicos (véanse las reglas de aumento de dosis) y, tras la revisión de los datos de seguridad interna por una comité interno de revisión de datos de seguridad y la valoración de la toxicidad aguda 72 h después de la segunda infusión recibida por el último sujeto tratado en cada cohorte. Tras
40 la fase de aumento de la dosis, 40 sujetos adicionales (32 para el principio activo y 8 para el placebo) se aleatorizarán en cada uno de los siguientes niveles de dosis: 2x50 mg, 2x200 mg, 2x500 mg, y 2x1000 mg, si se demuestra que los niveles de dosis se toleran durante la fase de aumento de la dosis. Se inscribirán en el estudio aproximadamente 205 sujetos.

45 Se obtendrán y registrarán los recuentos de células B (para valoraciones del estudio, véanse la Sección 4.5 y el Apéndice A-1). La campana de recuento se evaluará usando citometría de flujo durante un periodo de seguimiento de 48 semanas a partir del sexto mes de evaluación de la eficacia. La campana de agotamiento no se tendrá en cuenta en la toxicidad limitante de la dosis (DLC), sino en su lugar, el resultado farmacodinámico esperado del tratamiento con PRO7076.

50

En un subestudio opcional, se obtendrán de los sujetos sangre para análisis de suero y ARN, así como muestras de orina, en diferentes puntos temporales (véase la Sección 3.3.3). Dichas muestras se usarán para identificar biomarcadores que puedan ser predictivos de la respuesta del tratamiento con PRO70769 en sujetos con AR de moderada a grave.

55

Medidas de resultados

La medida de resultado principal de este estudio es la seguridad y la tolerabilidad de PRO70769 en sujetos con AR de moderada a grave.

60

Tratamiento del estudio

Las cohortes recibirán dos infusiones IV de PRO70769 o placebo equivalente en la dosis indicada los Días 1 y 15 según el siguiente plan de aumento de la dosis:

65

- 10 mg de PRO70769 o placebo equivalente: 4 sujetos con el principio activo, 1 control

- 50 mg de PRO70769 o placebo equivalente: 8 sujetos con el principio activo, 2 control
- 200 mg de PRO70769 o placebo equivalente: 8 sujetos con el principio activo, 2 control
- 500 mg de PRO70769 o placebo equivalente: 8 sujetos con el principio activo, 2 control
- 1000 mg de PRO70769 o placebo equivalente: 8 sujetos con el principio activo, 2 control

5

Eficacia

La eficacia de PRO70769 se medirá según las respuestas ACR. El porcentaje de sujetos que consigue una respuesta ACR20, ACR50, y ACR70 se resumirá por grupo de tratamiento y se generarán los intervalos de confianza del 95 % para cada grupo. Los componentes de esta respuesta y su variación respecto del valor inicial se resumirán por tratamiento y visita.

10

Conclusión

Los datos anteriores demostraron el éxito en la producción de anticuerpos de unión a CD20 humanizados, en particular de variantes de anticuerpos 2H7 humanizados, que mantuvieron e incluso mejoraron sus propiedades biológicas. Los anticuerpos 2H7 humanizados de la invención se unen a CD20 con afinidades similares al donante murino y los anticuerpos 2H7 quiméricos, y fueron eficaces para la eliminación de las células B en primates, conduciendo al agotamiento de las células B. Algunas variantes mostraron una actividad ADCC mejorada respecto a un anticuerpo quimérico dirigido contra CD20 actualmente utilizado para tratar el LNH, favoreciendo el uso de dosis más bajas de los anticuerpos terapéuticos en los pacientes. Además, aunque puede ser necesario que un anticuerpo quimérico que tiene restos FR de murino se administre a una dosis eficaz para conseguir un agotamiento completo de las células B para derivar una respuesta de los anticuerpos frente al mismo, los presentes anticuerpos humanizados se pueden administrar a dosis que consiguen un agotamiento parcial o completo de las células B, y para diferentes duraciones de tiempo, según se desee para la enfermedad y el paciente en particular. Además, estos anticuerpos demostraron estabilidad en solución. Estas propiedades de los anticuerpos 2H7 humanizados son perfectas para su uso como agente inmunoterapéutico en el tratamiento de cánceres positivos para CD20 y enfermedades autoinmunitarias; no se espera que estos anticuerpos sean inmunógenos o que sean al menos de inmunogenicidad menor que los anticuerpos dirigidos contra CD20 totalmente murinos o quiméricos en pacientes humanos.

30

Referencias

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular y similares, que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica. Dichas técnicas se explican ampliamente en la bibliografía. Véanse por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel et al., eds., 1987 actualizado); Essential Molecular Biology (T. Brown ed., IRL Press 1991); Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press 1991); Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes (A. Bothwell et al. eds., Bartlett Publ. 1990); Gene Transfer and Expression (M. Kriegler, Stockton Press 1990); Recombinant DNA Methodology II (R. Wu et al. eds., Academic Press 1995); PCR: A Practical Approach (M. McPherson et al., IRL Press at Oxford University Press 1991); Oligonucleotide Synthesis (M. Gait ed., 1984); Cell Culture for Biochemists (R. Adams ed, Elsevier Science Publishers 1990); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. Miller & M. Calos eds., 1987); Mammalian Cell Biotechnology (M. Butler ed., 1991); Animal Cell Culture (J. Pollard et al. eds., Humana Press 1990); Culture of Animal Cells, 2ª Ed. (R. Freshney et al. eds., Alan R Liss 1987); Flow Cytometry and Sorting (M. Melamed et al. eds., Wiley-Liss 1990); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Wirth M. y Hauser H. (1993); Immunochemistry in Practice, 3ª edición, A. Johnstone y R. Thorpe, Blackwell Science, Cambridge, MA, 1996; Techniques in Immunocytochemistry, (G. Bullock y P. Petrusz eds., Academic Press 1982,1983,1985,1989); Handbook of Experimental Immunology, (D. Weir y C. Blackwell, eds.); Current Protocols in Immunology (J. Coligan et al. eds. 1991); Immunoassay (E. P. Diamandis & T.K Christopoulos, eds., Academic Press, Inc., 1996); Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed) Academic Press, Nueva York; Ed Harlow y David Lane, Antibodies A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988; Antibody Engineering, 2ª edición (C. Borrebaeck, ed., Oxford University Press, 1995); y la serie Annual Review of Immunology; la serie Advances in Immunology.

55

También se divulga en el presente documento:

1. Un anticuerpo humanizado que se une a CD20 humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo es eficaz para agotar las células B de primate in vivo, comprendiendo el anticuerpo la región variable de la cadena H. (V_H) al menos una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO. 12 procedente de un anticuerpo dirigido contra CD20 humano y prácticamente los restos del marco de consenso (FR) humano del subgrupo III de la cadena pesada humana (V_HIII).
2. El anticuerpo de 1, que comprende además la secuencia de la CDR1 de la cadena H de la SEQ ID NO. 10 y la secuencia de la CDR2 de la SEQ ID NO. 11.
3. El anticuerpo de 2, que comprende además la secuencia de la CDR1 de la cadena L de la SEQ ID NO. 4, la secuencia de la CDR2 de la SEQ ID NO. 5, la secuencia de la CDR3 de la SEQ ID NO. 6 y prácticamente los

60

65

restos del marco de consenso (FR) humano del subgrupo I de la cadena ligera humana k I (Vkl).

4. El anticuerpo de las reivindicaciones anteriores, que comprende la secuencia V_H de la SEQ ID NO.8 (v16, como se muestra en la Fig.1B).

5. El anticuerpo de 4, además que comprende la secuencia V_L de la SEQ ID NO.2 (v16, como se muestra en la Fig.1A).

6. El anticuerpo de 3, en el que la región V_H está unida a una región constante de la cadena de IgG humana.

7. El anticuerpo de 6, en el que la IgG humana es IgG1 o IgG3.

8. El anticuerpo de 1, en el que el anticuerpo es 2H7.v16, que tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de la SEQ ID NO. 21 y 22, respectivamente, [como se muestra en la Fig. 6 y la Fig. 7.]

9. El anticuerpo de 1, en el que el anticuerpo es 2H7.v31 que tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de la SEQ ID NO. 2 y 23, respectivamente, [como se muestra en la Fig. 6 y en la Fig. 8].

10. El anticuerpo de 5, pero con las sustituciones de aminoácidos D56A y N100a en la cadena H y S92A en la cadena L. [v.96]

11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejora la actividad ADCC y/o CDC.

12. El anticuerpo de 11, en el que las sustituciones de aminoácidos son S298A/E333A/K334A.

13. El anticuerpo de 12, en el que el anticuerpo es 2H7.v31 que tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ LID NO. 23 [como se muestra en la Fig. 8].

14. El anticuerpo de cualquiera de 1-10, que comprende además al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que disminuye la actividad CDC.

15. El anticuerpo de cualquiera de 14, que comprende al menos la sustitución K322A.

16. El anticuerpo de 1-10 el que el anticuerpo es 2H7.v114 o 2H7.v115 que tiene una actividad ADCC mejorada al menos 10 veces en comparación con Rituxan.

17. El anticuerpo de 1 en el que las células B de primate proceden de ser humano y de macaco.

18. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores conjugado con un agente citotóxico.

19. El anticuerpo de 18 en el que el agente citotóxico es un isótopo radioactivo o una toxina.

20. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo se produce en células CHO.

21. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

22. Un vector de expresión que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

23. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de 21.

24. La célula hospedadora de 23 que produce el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

25. La célula hospedadora de 24 que es una célula CHO.

26. Un método para producir el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende cultivar la célula que produce el anticuerpo de 24 y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

27. Una composición que comprende el anticuerpo de 1 y un transportador.

28. La composición de 27 en la que el anticuerpo es 2H7.v16 y el transportador es un transportador farmacéuticamente aceptable.

29. Un artículo de fabricación que comprende un envase y una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

30. El artículo de fabricación de 29, que comprende además un prospecto que indica que la composición se puede usar para tratar el linfoma no Hodgkins.

31. Un método para inducir apoptosis en células B in vivo, que comprende poner en contacto las células B con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, destruyendo de esta forma las células B.

32. Un método para tratar un cáncer positivo para CD20, que comprende administrar a un paciente que padece el cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de unión a CD20 humanizado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

33. El método de 32 en el que el cáncer positivo para CD20 es un linfoma de células B o una leucemia.

34. El método de 33 en el que el cáncer positivo para CD20 es un linfoma de células no de Hodgkin (LNH) o una enfermedad de Hodgkin con predominancia de linfocitos (LPHD).

35. El método de 32, en el que el cáncer es una leucemia linfocítica crónica o SLL.

36. El método de 34 o 35, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en 2H7.v16, v31.v96, v114, v115 que tienen las correspondientes secuencias de aminoácidos que se muestran en las figuras y en las tablas.

37. El método de 34 o 35 el anticuerpo es 2H7.v16 que tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de la SEQ ID NO. 21 y 22, respectivamente, como se muestra en la Fig. 6 y la Fig. 7.

38. El método de la reivindicación 33, en el que el anticuerpo se administra en un intervalo de dosificación de aproximadamente 275-375 mg/m²

39. El método de la reivindicación 32, que comprende además administrar al paciente al menos un agente quimioterapéutico.

40. El método de la reivindicación 39, en el que el cáncer es un linfoma no de Hodgkin (LNH), y el agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y prednisolona.

41. Un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria, que comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad autoinmunitaria, una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de unión a CD20 humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

42. El método de la reivindicación 41, en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus sistémico eritematoso (LSE), enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjorgen y glomerulonefritis.
- 5 43. El método de la reivindicación 42, en el que la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.
44. El método de la reivindicación 43, que comprende además administrar al paciente un segundo agente terapéutico.
- 10 45. El método de la reivindicación 44, en el que el segundo agente terapéutico es un agente inmunosupresor.
46. El método de la reivindicación 45, en el que el agente inmunosupresor es metotrexato.
47. Un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria seleccionada entre el grupo que consiste en dermatomiositis, granulomatosis de Wegener, ANCA (incluida en la vasculitis), anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), deficiencia en factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, rechazo al trasplante de órgano sólido, enfermedad de injerto contra hospedador (GVFID), mediada por IgM, púrpura trombocitopénica trombótica (ITP), tiroiditis de Hashimoto, hepatitis autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfoide (VIH), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de grandes vasos, arteritis de células gigantes (de Takayasu), vasculitis de vasos intermedios, enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa, que comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de unión a CD20 o fragmento funcional del mismo.
- 15 48. El método de 47 en el que el anticuerpo de unión a CD20 es Rituxan®.
49. Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO.: _ del CD20 de macaco (mostrada en la Fig. 19), o una variante degenerada de dicha secuencia.
- 20 50. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. _ (mostrada en la Fig. 20) o de la SEQ ID NO. _ (Fig. 20) con sustituciones de aminoácidos conservativas.
- 25 51. Un vector que comprende el ácido nucleico de 50.
52. El vector de 51, que es un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de 49 unido operativamente a una secuencia de control de la expresión.
- 30 53. Una célula hospedadora que comprende al ácido nucleico de 50.
54. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO. _; Fig. 20] de CD20 de macaco.
- 35 55. Una formulación líquida que comprende un anticuerpo 2H7 humanizado a 20 mg/ml, sulfato de histidina 10 mM a pH 5,8, 60 mg/ml de sacarosa, 0,2 mg/ml de polisorbato 20.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> GENENTECH, INC.
- <120> Variantes de Inmunoglobulina y Usos de las Mismas
- <130> SMW/FP6540785
- 45 <140> EP
- <141> 16-12-2003
- <150> 03813759.2
- 50 <151> 16-12-2003
- <150> PCT/US03/40426
- <151> 16-12-2003
- 55 <150> US 60/434.115
- <151> 16-12-2002
- <150> US 60/526.163
- <151> 01-12-2003
- 60 <160> 38
- <210> 1
- <211> 107
- <212> PRT
- 65 <213> *Mus musculus*

ES 2 633 311 T3

<400> 1

```

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

```

Lys Arg

5 <210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> La secuencia es sintética

<400> 2

```

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

```

Lys Arg

15 <210> 3
 <211> 108
 <212> PRT

ES 2 633 311 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia es sintética

5

<400> 3

```

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

Ile Lys Arg
    
```

10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<400> 4

```

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1           5           10
    
```

20

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

25

<400> 5

```

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
 1           5
    
```

30

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 6

35

```

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 1           5
    
```

<210> 7

<211> 122

ES 2 633 311 T3

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

Ser Ser

<210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia es sintética

<400> 9

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

<210> 10

ES 2 633 311 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
 1 5 10

10 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 11

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15

Lys Gly

20 <210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 12

25 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

30 <210> 13
 <211> 5679
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia es sintética

35 <400> 13

gaattcaact tctccatact ttggataagg aaatacagac atgaaaaatc 50
 tcattgctga gttggttattt aagcttgccc aaaaagaaga agagtcgaat 100
 gaactgtgtg cgcaggtaga agctttggag attatcgtca ctgcaatgct 150
 tcgcaatatg gcgcaaaatg accaacagcg gttgattgat caggtagagg 200
 gggcgctgta cgaggtaaag cccgatgcca gcattcctga cgacgatacg 250
 gagctgctgc gcgattacgt aaagaagtta ttgaagcadc ctcgtcagta 300

ES 2 633 311 T3

aaaagttaat cttttcaaca gctgtcataa agttgtcacg gccgagactt 350
 atagtcgctt tgtttttatt ttttaatgta tttgtaacta gaattcgagc 400
 tcggtaaccg gggatcctct agaggttgag gtgatttt atg aaa 444
 Met Lys
 1
 aag aat atc gca ttt ctt ctt gca tct atg ttc gtt ttt 483
 Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe
 5 10 15
 tct att gct aca aac gcg tac gct gat atc cag atg acc 522
 Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Met Thr
 20 25
 cag tcc ccg agc tcc ctg tcc gcc tct gtg ggc gat agg 561
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 30 35 40
 gtc acc atc acc tgc aga gcc agt cag agc gtg tcg act 600
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr
 45 50
 agc tct tat agc tat atg cac tgg tat caa cag aaa cca 639
 Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 55 60 65
 gga aaa gct ccg aaa cta ctg att tac tat gct agc aac 678
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn
 70 75 80
 ctc gag tct gga gtc cct tct cgc ttc tct gga tcc ggt 717
 Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 85 90
 tct ggg acg gat ttc act ctg acc atc agc agt ctg cag 756
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 95 100 105
 cca gaa gac ttc gca act tat tac tgt caa cac tct tgg 795
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 110 115
 ggt att ccg cgc aca ttt gga cag ggt acc aag gtg gag 834
 Gly Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 120 125 130
 atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc 873
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 135 140 145
 ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gct tct 912
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 150 155
 gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 951
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 160 165 170

ES 2 633 311 T3

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt 990
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 175 180

aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac 1029
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 185 190 195

agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa 1068
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 200 205 210

gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc 1107
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 215 220

acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc 1146
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 225 230 235

aac agg gga gag tgt t aagctgat cctctacgcc ggaagcagtcg 1190
 Asn Arg Gly Glu Cys
 240 241

tggccctagt acgcaagttc acgtaaaaag ggtatctaga ggttgaggtg 1240

atttt atg aaa aag aat atc gca ttt ctt ctt gca tct 1278
 Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser
 1 5 10

atg ttc gtt ttt tct att gct aca aac gcg tac gct gag 1317
 Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu
 15 20

gtt cag ctg gtg gag tct ggc ggt ggc ctg gtg cag cca 1356
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 25 30 35

ggg ggc tca ctc cgt ttg tcc tgt gca gct tct ggc tac 1395
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr
 40 45 50

acc ttc acc gaa tat atc atc cac tgg gtc cgt cag gcc 1434
 Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala
 55 60

ccg ggt aag ggc ctg gaa tgg gtt gca tcg att aat cct 1473
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Asn Pro
 65 70 75

gac tac gac atc acg aac tat aac cag cgc ttc aag ggc 1512
 Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly
 80 85

cgt ttc act ata agt cgc gac gat tcc aaa aac aca tta 1551
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu
 90 95 100

tac ctg cag atg aac agc ctg cgt gct gag gac act gcc 1590

ES 2 633 311 T3

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 105 110 115
 gtc tat tat tgt gct cga tgg atc agc gat ttc ttc gac 1629
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp
 120 125
 tac tgg ggt caa gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg gcc 1668
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140
 tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc 1707
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 145 150
 tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc 1746
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 155 160 165
 ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg 1785
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 170 175 180
 tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc 1824
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 185 190
 ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc 1863
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205
 agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag 1902
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215
 acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc 1941
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 220 225 230
 aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa 1980
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 235 240 245
 act cac aca t gaccaccgca tgcaccagta tcgtccattc 2020
 Thr His Thr
 248
 cgacagcacc gccagtcact atggcgtgct gctagegccc ccctatacct 2070
 tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga 2120
 cctgaatgga agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa 2170
 ttggagccaa tcaattcttg cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct 2220
 tggcagaaca tatccatcgc gtcgcaccac tccagcagcc gcacgcggcg 2270
 catctcgggc agcgttggtt cctggccacg ggtgcgcatg atcgtgctcc 2320
 tgtcgttgag gaccgggcta ggctggcggg gttgccttac tggttagcag 2370

ES 2 633 311 T3

aatgaatcac cgatacgcga gcgaacgtga agcgactgct gctgcaaaaac 2420
gtctgcgacc tgagcaacaa catgaatggt ctteggtttc cgtgtttcgt 2470
aaagtctgga aacgcggaag tcagcgccct gcaccattat gttccggatc 2520
tgcatacgcag gatgctgctg gctaccctgt ggaacaccta catctgtatt 2570
aacgaagcgc tggcattgac cctgagtgat ttttctctgg tcccgccgca 2620
tccataccgc cagttgttta ccttcacaac gttccagtaa ccgggcatgt 2670
tcatcatcag taaccctgat cgtgagcacc ctctctcgtt tcatcggtat 2720
cattaccccc atgaacagaa attccccctt acacggaggc atcaagtgac 2770
caaacaggaa aaaaccgccc ttaacatggc ccgctttatc agaagccaga 2820
cattaacgct tctggagaaa ctcaacgagc tggacgcgga tgaacaggca 2870
gacatctgtg aatcgcttca cgaccacgct gatgagcttt accgcagcat 2920
ccggaaattg taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatttttg 2970
ttaaatcagc tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt 3020
ataaatcaaa agaatagacc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg 3070
aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa 3120
aaccgtctat cagggctatg gccactacg tgaaccatca ccctaataca 3170
gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa ccctaaaggg 3220
agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaaac tggcgagaaa 3270
ggaaggggag aaagcgaaag gagcggggcg tagggcgctg gcaagtgtag 3320
cggtcacgct gcgcgtaacc accacaccgc ccgcgcttaa tgcgccgcta 3370
cagggcgctt ccgcacctct cctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa 3420
cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg 3470
atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg 3520
tgtcggggcg cagccatgac ccagtcacgt agcgatagcg gagtgtatac 3570
tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat 3620
gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacacaggc 3670
gctcttccgc ttctcgcctc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg 3720
cggcgagcgg taccagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 3770
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 3820
ccaggaaccg taaaaaggcc gcggtgctgg cgtttttcca taggctccgc 3870

ES 2 633 311 T3

cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 3920
 cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg 3970
 tgcgctctcc tgttccgacc ctgcccgtta ccggatacct gtccgccttt 4020
 ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 4070
 cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc 4120
 ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc 4170
 aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 4220
 gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc tacagagttc ttgaagtgg 4270
 ggcttaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 4320
 ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 4370
 acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta 4420
 cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg 4470
 tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggcatgag 4520
 attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aatgaagtt 4570
 ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa 4620
 tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttogttcatc 4670
 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct 4720
 taccatctgg ccccagtgtc gcaatgatac cgcgagacc acgtcacccg 4770
 gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 4820
 aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattggtgcc 4870
 gggagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt 4920
 gccattgctg caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggettc 4970
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt 5020
 tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt 5070
 aagttggccg cagtgttacc actcatgggt atggcagcac tgcataatc 5120
 tcttactgtc atgcatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact 5170
 caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 5220
 ccggcgtcaa cacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 5270
 gctcatcatt ggaaaacggt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac 5320
 cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct 5370

ES 2 633 311 T3

tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagcaa aacaggaag 5420
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac 5470
tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 5520
ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 5570
ggttccgcg acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca 5620
ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggccttt 5670
cgtcttcaa 5679

<210> 14
<211> 241
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> La secuencia es sintética

<400> 14

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

ES 2 633 311 T3

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 185 190 195

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 200 205 210

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 215 220 225

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 230 235 240

Cys

<210> 15
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia es sintética

<400> 15

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe
 1 5 10 15

Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 20 25 30

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

Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Val
 50 55 60

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Asn
 65 70 75

Pro Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg
 80 85 90

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 95 100 105

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 110 115 120

Arg Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 125 130 135

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 140 145 150

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 155 160 165

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 170 175 180

ES 2 633 311 T3

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 185 190 195

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 200 205 210

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 215 220 225

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 245

<210> 16
 <211> 5678
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia es quimérica

<400> 16

gaattcaact tctccatact ttggataagc aaatacagac atgaaaaatc 50

tcattgctga gttggtatct aagcttgccc aaaaagaaga agagtcgaat 100

gaactgtgtg cgcaggtaga agctttggag attatcgtca ctgcaatgct 150

tgcgaatatg gcgcaaaatg accaacagcg gttgattgat caggtagagg 200

ggcgctgta cgaggtaaag cccgatgcca gcattcctga cgacgatagc 250

gagctgctgc gcgattacgt aaagaagtta ttgaagcacc ctcgtcagta 300

aaaagttaat cttttcaaca gctgtcataa agttgtcacg gccgagactt 350

atagtcgctt tgtttttatt ttttaatgta tttgtaacta gaattcgagc 400

tcggtaccgc gggatcctct agaggttgag gtgattt atg aaa 443
 Met Lys
 1

aag aat atc gca ttt ctt ctt gca tct atg ttc gtt ttt 482
 Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe
 5 10 15

tct att gct aca aac gcg tac gct cag ata gta ctg tcc 521
 Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Gln Ile Val Leu Ser
 20 25

cag tcc ccg gct atc ctg tcc gcc tct cct ggc gag aag 560
 Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
 30 35 40

gtc act atg acc tgc aga gcc agc tct tct gtg agc tat 599
 Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
 45 50

ES 2 633 311 T3

atg cat tgg tat caa cag aaa cca gga agc tct ccg aaa 638
Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
55 60 65

cca tgg att tac gct cca tcg aac ctc gcg tct gga gtc 677
Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
70 75 80

cct gcg cgc ttc tct gga tcc ggt tct ggg act agt tac 716
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr
85 90

tct ctg acc atc agc aga gtg gag gca gaa gac gcc gca 755
Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala
95 100 105

act tat tac tgt caa cag tgg agc ttc aat ccg ccc aca 794
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
110 115

ttt gga gcc ggc acc aag ctg gag ctc aaa cga act gtg 833
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val
120 125 130

gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 872
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
135 140 145

cag ttg aaa tct gga act gct tct gtt gtg tgc ctg ctg 911
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
150 155

aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag 950
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
160 165 170

gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt 989
Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
175 180

gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc 1028
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
185 190 195

agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 1067
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
200 205 210

cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg 1106
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
215 220

agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 1145
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 236

t aagc tgatcctcta cgccggacgc atcgtggccc tagtacgcaa 1190

gttcacgtaa aaagggtatc tagaggttga ggtgatttt atg aaa 1235
Met Lys

ES 2 633 311 T3

1

aag aat atc gca ttt ctt ctt gca tct atg ttc gtt ttt 1274
 Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe
 5 10 15

tct att gct aca aac gcg tac gct cag gct tat ctg cag 1313
 Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Gln Ala Tyr Leu Gln
 20 25

cag tct ggc gcc gag ctg gtg cgg cca gga gct agc gtc 1352
 Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
 30 35 40

aag atg tcc tgt aaa gct tct ggc tac acc ttc acc agc 1391
 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
 45 50

tat aac atg cat tgg gtc aag cag aca ccg agg caa ggc 1430
 Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly
 55 60 65

ctg gaa tgg att gga gcg atc tat cct ggc aac ggc gac 1469
 Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp
 70 75 80

acg agc tat aac cag aag ttc aag ggc aag gcc act ctg 1508
 Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
 85 90

act gtg gac aag tcc agc agt act gcc tac atg caa ctg 1547
 Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
 95 100 105

agc agc ctg act tct gag gac agc gct gtc tac ttt tgt 1586
 Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 110 115

gct cgc gtg gtc tac tat agc aac agc tac tgg tac ttc 1625
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe
 120 125 130

gac gtc tgg ggt acc gga acc aca gtc acc gtc tcc tcg 1664
 Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 135 140 145

gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc 1703
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 150 155

tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc 1742
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 160 165 170

tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg 1781
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 175 180

tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc 1820
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

ES 2 633 311 T3

185		190		195	
ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc	1859				
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu					
200		205		210	
agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc	1898				
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr					
215		220			
cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac	1937				
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn					
225		230		235	
acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac	1976				
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp					
240		245			
aaa act cac aca t g accaccgcat gcaccagtat cgtccattcc	2020				
Lys Thr His Thr					
250		253			
gacagcatcg ccagtcacta tggcgtgctg ctagecgegc cctatacctt	2070				
gtctgectcc ccgcgttgcg tcgcggtgca tggagccggg ccacctcgac	2120				
ctgaatggaa gccggcggca cctcgctaac ggattcacca ctccaagaat	2170				
tggagccaat caattcttgc ggagaactgt gaatgcgcaa accaaccctt	2220				
ggcagaacat atccatcgcg tccgccatct ccagcagccg cagcggcgc	2270				
atctcgggca gcggtgggtc ctggccacgg gtgcgcatga tcgtgctcct	2320				
gtcgttgagg acccggctag gctggcgggg ttgccttact ggtagcaga	2370				
atgaatcacc gatacgcgag cgaacgtgaa gcgactgctg ctgcaaaacg	2420				
tctgcgacct gagcaacaac atgaatggtc ttcggtttcc gtgtttcgta	2470				
aagtctggaa acgcggaagt cagcgccttg caccattatg ttcggatct	2520				
gcacgcgagg atgctgctgg ctaccctgtg gaacacctac atctgtatta	2570				
acgaagcgtt ggcattgacc ctgagtgatt tttctctggt cccgccgcat	2620				
ccataccgcc agttgtttac cctcacaacg ttccagtaac cgggcatggt	2670				
catcatcagt aaccctgata gtgagcatcc tctctcgttt catcggatc	2720				
attaccccca tgaacagaaa ttccccctta cacggaggca tcaagtgacc	2770				
aaacaggaaa aaaccgccct taacatggcc cgctttatca gaagccagac	2820				
attaacgctt ctggagaaac tcaacgagct ggacgcggat gaacaggcag	2870				
acatctgtga atcgcttcac gaccacgctg atgagcttta ccgcagcatc	2920				
cggaattgt aaacgttaat attttgtaa aattcgcgtt aaattttgt	2970				

ES 2 633 311 T3

taaatcagct cattttttaa ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta 3020
 taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt gagtgttggt ccagtttggg 3070
 acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa 3120
 accgtctatc agggctatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatacaag 3170
 ttttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaagggg 3220
 gccccgatt tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt ggcgagaaaag 3270
 gaaggggaaga aagcgaaggg agcgggagct agggcgctgg caagtgtagc 3320
 ggtcacgctg cgcgtaacca ccacacccgc cgcgcttaat gcgccctac 3370
 agggcgcgtc cgcacccctgc ctgcgcggtt tcggtgatga cggtgaaaac 3420
 ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc tgtaagcggg 3470
 tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt 3520
 gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact 3570
 ggcttaacta tgcggcatca gacgagattg tactgagagt gcaccatatg 3620
 cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcacagggcg 3670
 ctcttccgct tectcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 3720
 ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa 3770
 tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc 3820
 caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc 3870
 ccctgacga gcacacaaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaaac 3920
 ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt 3970
 gcgctctcct gttccgacct tgcgccttac cggataacctg tccgcctttc 4020
 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 4070
 agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc 4120
 cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 4170
 acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 4220
 attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg 4270
 gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 4320
 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 4370
 caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac 4420
 gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg 4470

ES 2 633 311 T3

ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga 4520
 ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt 4570
 taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat 4620
 gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 4670
 atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt 4720
 accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg 4770
 ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga 4820
 agtggctctg caactttatc cgctccatc cagtctatta attggtgccg 4870
 ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg 4920
 ccattgctgc aggcacgctg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 4970
 ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggt 5020
 gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta 5070
 agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct 5120
 cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 5170
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc 5220
 cggcgtcaac acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 5270
 ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc 5320
 gctggtgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt 5370
 cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg 5420
 caaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 5470
 catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc 5520
 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 5570
 gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat 5620
 tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc 5670
 gtcttcaa 5678

<210> 17
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia es quimérica

<400> 17

5

10

ES 2 633 311 T3

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

<210> 18
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia es quimérica

<400> 18

ES 2 633 311 T3

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

5 <210> 19
 <211> 5391
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 633 311 T3

<223> La secuencia es sintética

<400> 19

ttcgagctcg cccgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 50

5

tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac 100

ES 2 633 311 T3

ttacggtaaa tggccccgct ggctgaccgc ccaacgaccc cgcgccattg 150
 acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca 200
 ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 250
 atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg 300
 aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 350
 tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgggtgatgc 400
 ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga 450
 tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca 500
 aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 550
 aaatgggcgg taggcgtgta cggtgggagg tctatataag cagagctcgt 600
 ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc catccaagct gttttgaact 650
 ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcgccggg gaacgggtgca 700
 ttggaacgcg gattccccgt gccaaagagt acgtaagtac cgcctataga 750
 gtctataggc ccacccccct ggcttcgtta gaacgcggct acaattaata 800
 cataacctta tgtatcatac acatacgatt taggtgacac tatagaataa 850
 catccacttt gcctttctct ccacaggtgt ccaactccag gtccaactgc 900
 acctcggttc tatcgattga attccaccat gggatggcca tgtatcatcc 950
 tttttctagt agcaactgca actggagtac attcagatat ccagatgacc 1000
 cagtcccccg gctccctgtc cgctctctgt ggcgataggg tcaccatcac 1050
 ctgccgtgcc agtcaggaca tccgtaatta tttgaactgg tatcaacaga 1100
 aaccaggaaa agctccgaaa ctactgattt actatacctc ccgcctggag 1150
 tetggagtec cttctcgtt ctctggttct ggttctggga cggattacac 1200
 tetgaccatc agtagtctgc aaccggagga cttcgcaact tattactgtc 1250
 agcaaggtaa tactctgccg tggacgttcg gacagggcac caaggtggag 1300
 atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcactctcc cgccatctga 1350
 tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg ctgaataact 1400
 tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 1450
 tcgggtaact ccagggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac 1500
 ctacagcctc agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac 1550
 acaaagtcta cgctgcgaa gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc 1600

ES 2 633 311 T3

acaaagagct tcaacagggg agagtgttaa gcttggccgc catggcccaa 1650
 cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacia 1700
 atttcacaaa taaagcattt ttttactgac attctagtgg tggtttgcc 1750
 aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcgatcggg aattaattcg 1800
 gcgcagcacc atggcctgaa ataacctctg aaagaggaac ttggttaggt 1850
 accttctgag gcggaaagaa ccagctgtgg aatgtgtgac agttaggggtg 1900
 tggaaagtc ccaggtccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac 1950
 tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt cccagggctc ccagcaggc 2000
 agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc 2050
 cctaactcgc cccatcccgc cctaactcgc gccaggtcc gccattctc 2100
 cgccccatgg ctgactaatt tttttattt atgcagaggc cgaggccgcc 2150
 tcggcctctg agctattcca gaagtgtga ggaggctttt ttggaggcct 2200
 aggttttgc aaaaagctgt taacagcttg gcactggccg tcgttttaca 2250
 acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaactaat cgcttgcag 2300
 cacatcccc cttcgcagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat 2350
 cgccctccc aacagttgcg tagcctgaat ggcgaaatggc gcctgatgcg 2400
 gtattttctc cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc atacgtcaaa 2450
 gcaaccatag tacgcgcct gttagcggcg attaagcgcg gcgggtgtgg 2500
 tggttacgc cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcgccgt 2550
 ctttctgctt tcttccctc ctttctcgc acgttcgcgc gctttccccg 2600
 tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt agtgctttac 2650
 ggcacctga cccccaaaaa cttgatttgg gtgatggttc acgtagtggg 2700
 ccatcgcct gatagacggg ttttcgcct ttgacgttgg agtccacgtt 2750
 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aacctatct 2800
 cgggctatcc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggctattgg 2850
 ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat 2900
 attaacgttt acaattttat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 2950
 ccgcatagtt aagccaactc cgtatcgcct acgtgactgg gtcattggctg 3000
 cgccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg 3050
 ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat 3100

ES 2 633 311 T3

gtgtcagagg ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgagg cagtattctt 3150
 gaagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg 3200
 ataataatgg tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg 3250
 cggaaacctt atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc 3300
 teatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag 3350
 agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgc cttattccct tttttgcggc 3400
 attttgcctt cctgtttttg ctcaccocaga aacgctgggt aaagtaaaag 3450
 atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc 3500
 aacagcggta agatccttga gagttttcgc ccgaagaac gttttccaat 3550
 gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg ccgggtatta tcccgatgag 3600
 acgcggggca agagcaactc ggtcgcgcga tacactatc tcagaatgac 3650
 ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac 3700
 agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacctgcgg 3750
 ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt 3800
 ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaaccgga 3850
 gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgccagcag 3900
 caatggcaac aacgttgccg aactattaa ctggcgaaact acttactcta 3950
 gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg 4000
 accacttctg cgtcggccc ttcggctgg ctggtttatt gctgataaat 4050
 ctggagccgg tgagcgtggg tctcgggta tcattgcagc actggggcca 4100
 gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc 4150
 aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga 4200
 ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt 4250
 gatttaaaac ttcattttta atttaaaag atctaggtga agatcctttt 4300
 tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttcactgag 4350
 cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tctttttttt 4400
 ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg 4450
 ggtttgtttg ccgatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg 4500
 gcttcagcag agcgcagata ccaataactg tcttctagt gtagccgtag 4550
 ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgctacat acctcgtct 4600

ES 2 633 311 T3

gctaatacctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtetta 4650
ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc 4700
tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 4750
cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg agaaagcgcc acgcttcccc 4800
aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggc cggaacagga 4850
gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc 4900
tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 4950
caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg 5000
ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttcttcc ctgcgttacc 5050
ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg 5100
ctcgcgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg 5150
gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcggt ggccgattca 5200
ttaatccagc tggcacgaca ggtttcccgga ctggaaagcg ggcagtgagc 5250
gcaacgcaat taatgtgagt tacctcactc attaggcacc ccaggcttta 5300
cactttatgc ttccgctcgt tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca 5350
atttcacaca ggaacagct atgacatga ttacgaatta a 5391

<210> 20
<211> 6135
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> La secuencia es sintética

10

<400> 20

ES 2 633 311 T3

attcgagctc gcccgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa 50
ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa 100
cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt 150
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 200
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta 250
catcaagtgt atcatatgcc aagtagccc cctattgacg tcaatgacgg 300
taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 350
ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 400
cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 450
attccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 500

ES 2 633 311 T3

aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgtgta acaactccgc cccattgacg 550
 caaatgggcg gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctcg 600
 tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc 650
 tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccgcggccg ggaacgggtgc 700
 attggaacgc ggattccccg tgccaagagt gacgtaagta ccgcctatag 750
 agtctatagg cccacccctt tggcttcggtt agaacggggc tacaattaat 800
 acataacctt atgtatcata cacatacgat ttaggtgaca ctatagaata 850
 acatccactt tgcctttctc tccacagggtg tccactccca ggtccaactg 900
 cacctcgggtt ctatcgattg aattccacca tgggatggtc atgtatcctc 950
 ctttttctag tagcaactgc aactggagta cattcagaag ttcagctggt 1000
 ggagtctggc ggtggcctgg tgcagccagg gggctcactc cgtttgtcct 1050
 gtgcagcttc tggctactcc tttaccggct aactatgaa ctgggtgcgt 1100
 caggccccag gtaagggcct ggaatgggtt gcaactgatta atccttataa 1150
 aggtgttact acctatgccg atagegtcaa gggccgtttc actataagcg 1200
 tagataaatc caaaaacaca gcctacctgc aaatgaacag cctgcgtgct 1250
 gaggacactg ccgtctatta ttgtgctaga agcggatact acggcgatag 1300
 cgactgggat tttgacgtct ggggtcaagg aaccctggtc accgtctcct 1350
 cggcctccac caagggccca tcggctcttc ccctggcacc ctccctcaag 1400
 agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcttggta aggactactt 1450
 ccccgaaacc gtgacgggtg cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg 1500
 tgcacacctt cccggctgtc ctacagtctt caggactcta ctccctcagc 1550
 agcgtggtga ctgtgccctc tagcagcttg ggcacccaga cctacatctg 1600
 caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc 1650
 ccaaattctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 1700
 ctctggggg gaccgtcagt ctctctctc cccccaaaac ccaaggacac 1750
 cctcatgate tccgggacc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga 1800
 gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1850
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta 1900
 ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca 1950
 aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 2000

ES 2 633 311 T3

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac 2050
 cctgccccca tcccgggaag agatgaccaa gaaccaggtc agcctgaact 2100
 gcctggteaa aggcttctat cccagcgcaca tcgccgtgga gtgggagagc 2150
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc 2200
 cgacggctcc ttcttctctc acagcaagct caccgtggac aagagcaggt 2250
 ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcattg ggcctctgac 2300
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagtgcg 2350
 acggccctag agtcgacctg cagaagcttg gccgccatgg cccaacttgt 2400
 ttattgcagc ttataatggt taaaaataaa gcaatagcat cacaaatttc 2450
 acaataaag ctttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact 2500
 catcaatgta tcttatcatg tctggatcga tcgggaatta attcggcgca 2550
 gcaccatggc ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggc taggtacctt 2600
 ctgaggcggg aagaaccatc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtggaa 2650
 agtccccagg ctcccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcattcfaat 2700
 tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccc a ggcctcccag caggcagaag 2750
 tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa 2800
 ctccgcccac ccgccccta actccgcca gttccgcca ttctccgccc 2850
 catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc 2900
 ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggccctaggct 2950
 tttgcaaaaa gctgttaaca gcttggcaact ggccgtcgtt ttacaacgtc 3000
 gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatgcct tgcagcacat 3050
 cccccctcg ccagttggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc 3100
 ttcccaacag ttgcgtagcc tgaatggcga atggcgctg atgcgggtatt 3150
 ttctccttac gcattctgtc ggtatttcac accgcatacg tcaaagcaac 3200
 catagtacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt 3250
 acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt 3300
 cgctttcttc ccttctcttc tcgccacggt ccgcggcttt ccccgtaag 3350
 ctctaaatcg ggggctccct ttagggctcc gatttagtgc tttacggcac 3400
 ctgaccccc aaaaacttga tttgggtgat ggttcaagta gtgggacatc 3450
 gccctgatag acggtttttc gcccttgac gttggagtc accgttcttta 3500

ES 2 633 311 T3

atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaacce tatctcgggc 3550
 tattcctttg atttataagg gattttgccg atttcggcct attgggttaa 3600
 aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa 3650
 cgtttacaat tttatgggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca 3700
 tagttaagcc aactccgcta tcgctacgtg actgggtcat ggctgcgccc 3750
 cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc 3800
 ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc 3850
 agagggtttc accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagta ttcttgaaga 3900
 cgaaagggcc tcgtgatagc cctatTTTTA taggttaatg tcatgataat 3950
 aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa 4000
 cccctatttg tttatTTTTc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 4050
 agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 4100
 gagtattcaa catttcgctg tcgcccttat tccctTTTTt gcggcatttt 4150
 gccttctctg ttttgcctac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 4200
 gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag 4250
 cggtaaagtc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga 4300
 gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccc tgatgacgcc 4350
 gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg 4400
 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa 4450
 gagaattatg cagtgcctgc ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac 4500
 ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca 4550
 caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcggtgggaa ccggagctga 4600
 atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc agcagcaatg 4650
 gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 4700
 ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac 4750
 ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga 4800
 gccggtgagc gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg ggcagatgg 4850
 taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 4900
 tggatgaacg aatagacag atcgtcgaga taggtgcctc actgattaag 4950
 cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 5000

ES 2 633 311 T3

aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata 5050
 atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca 5100
 gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 5150
 cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 5200
 gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc 5250
 agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 5300
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa 5350
 tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg 5400
 ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac 5450
 ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac 5500
 tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg 5550
 agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 5600
 cacgaggggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg 5650
 ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg 5700
 gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 5750
 ggcttttgc tggccttttg ctccatggtt ctttctgcg ttatcccctg 5800
 attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 5850
 cgcagccgaa cgaccgagcg cagcagtcga gtgagcggg aagcgggaaga 5900
 gcgcccataa cgcaaaccgc ctctccccgc gcggttgccg attcattaat 5950
 ccaactggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcac 6000
 gcaattaatg tgagttacct cactcattag gcaccccagg ctttacactt 6050
 tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcggg taacaatttc 6100
 acacaggaaa cagctatgac catgattacg aatta 6135

<210> 21
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> La secuencia es sintética

10

<400> 21

ES 2 633 311 T3

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

<210> 22
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia es sintética

<400> 22

ES 2 633 311 T3

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

ES 2 633 311 T3

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

ES 2 633 311 T3

				335						340					345
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
				350					355					360	
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
				365					370					375	
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
				380					385					390	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
				395					400					405	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
				410					415					420	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
				425					430					435	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
				440					445					450	
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	
				455					460					465	
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
				470											

<210> 23
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> La secuencia es sintética

10

<400> 23

ES 2 633 311 T3

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

ES 2 633 311 T3

				110						115					120
Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				125					130					135	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
				140					145					150	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
				155					160					165	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
				170					175					180	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				185					190					195	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
				200					205					210	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	
				215					220					225	
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	
				230					235					240	
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
				245					250					255	
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
				260					265					270	
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
				275					280					285	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	
				290					295					300	
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
				305					310					315	
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
				320					325					330	
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
				335					340					345	
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	
				350					355					360	
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
				365					370					375	
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
				380					385					390	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
				395					400					405	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	

ES 2 633 311 T3

```

                410                415                420
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
                425                430                435

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
                440                445                450

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
                455                460                465

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                470
    
```

5 <210> 24
 <211> 891
 <212> ADN
 <213> *Macaca fascicularis*
 <400> 24

```

        atg aca aca ccc aga aat tca gta aat ggg act ttc 36
        Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe
           1                5                10

        cca gca gag cca atg aaa ggc cct att gct atg caa cct 75
        Pro Ala Glu Pro Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Pro
           15                20                25

        ggt cca aaa cca ctc ctc agg agg atg tct tca ctg gtg 114
        Gly Pro Lys Pro Leu Leu Arg Arg Met Ser Ser Leu Val
           30                35

        ggt ccc acg caa agc ttc ttc atg agg gaa tct aag gct 153
        Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu Ser Lys Ala
           40                45                50

        ttg ggg gct gtc cag att atg aat ggg ctc ttc cac att 192
        Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
           55                60

        gcc ctg ggg ggt ctt ctg atg atc cca gca ggg atc tat 231
        Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr
           65                70                75

        gca ccc atc tgt gtg act gtg tgg tac cct ctg tgg gga 270
        Ala Pro Ile Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly
           80                85                90

        ggc att atg tat att att tcc gga tca ctc ctg gca gca 309
        Gly Ile Met Tyr Ile Ile Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala
           95                100

        acg gag aaa aac tcc agg aag tgt ttg gtc aaa gga aaa 348
        Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu Val Lys Gly Lys
           105                110                115

        atg ata atg aat tca ttg agc ctc ttt gct gcc att tct 387
        Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile Ser
           120                125
    
```

ES 2 633 311 T3

gga atg att ctt tca atc atg gac ata ctt aat att aaa 426
 Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys
 130 135 140

att tcc cat ttt tta aaa atg gag agt ctg aat ttt atc 465
 Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile
 145 150 155

aga gtt cac aca cca tat att aac ata tac aac tgt gaa 504
 Arg Val His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu
 160 165

cca gct aat ccc tct gag aaa aac tct cca tct act caa 543
 Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln
 170 175 180

tac tgt tac agc ata caa tct ctg ttc ctg ggc att ttg 582
 Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu
 185 190

tca gtg atg ctg atc ttt gcc ttc ttc cag gaa ctt gta 621
 Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val
 195 200 205

ata gct ggc atc gtt gag aat gaa tgg aga aga aca tgc 660
 Ile Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Arg Arg Thr Cys
 210 215 220

tcc aga ccc aaa tct agc gta gtt ctc ctg tca gct gaa 699
 Ser Arg Pro Lys Ser Ser Val Val Leu Leu Ser Ala Glu
 225 230

gaa aaa aaa gaa caa gtc att gaa ata aaa gaa gaa gtg 738
 Glu Lys Lys Glu Gln Val Ile Glu Ile Lys Glu Glu Val
 235 240 245

gtt ggg cta act gaa aca tct tcc caa cca aag aat gaa 777
 Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro Lys Asn Glu
 250 255

gaa gcc att gaa att att cca atc caa gaa gag gaa gaa 816
 Glu Ala Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
 260 265 270

gaa gaa aca gag aca aac ttt cca gaa cct ccc caa gat 855
 Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp
 275 280 285

cag gaa tct tca cca ata gaa aat gac agc tct cct 891
 Gln Glu Ser Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
 290 295 297

<210> 25
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

5

<400> 25

ES 2 633 311 T3

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

ES 2 633 311 T3

<211> 297
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 26

ES 2 633 311 T3

<210> 27
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> La secuencia es sintética
<400> 27
10 ctacacctc acgagctata acatgcactg ggtccg 36
<210> 28
<211> 51
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> La secuencia es sintética
20 <400> 28
gattaatcct gacaacggcg acacgagcta taaccagaag ttcaagggcc 50
g 51
<210> 29
25 <211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
30 <223> La secuencia es sintética
<400> 29
gaatgggtg cagcgatcta tcttggaac ggcgacac 38
35 <210> 30
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> La secuencia es sintética
<400> 30
attattgtgc tcgagtggtc tactatagca acagctactg gtacttcgac 50
45 gtctggggtc aagga 65
<210> 31
<211> 36
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> La secuencia es sintética
55 <400> 31
ctgcacagcc agcttctg tcagctatat gcattg 36
<210> 32
<211> 42
60 <212> ADN

ES 2 633 311 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia es sintética

5

<400> 32
aactactgat ttacgtcca tcgaacctcg cgtctggagt cc 42

<210> 33
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> La secuencia es sintética

15

<400> 33
tattactgtc aacagtggag ctcaatccg cccacattg gacag 45

20

<210> 34
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> La secuencia es sintética

<400> 34
gttcactat aagtgtcgac aagtcacaaa acacatt 37

30

<210> 35
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> La secuencia es sintética

<400> 35
gccaggatag atggcgccaa cccattccag gcc 33

40

<210> 36
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> La secuencia es sintética

<400> 36
aagctccgaa accactgatt tacgct 26

50

<210> 37
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> La secuencia es sintética

60

<400> 37
agttttgaga gcaaaatg 18

65

<210> 38
<211> 18
<212> ADN

ES 2 633 311 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia es sintética

5

<400> 38

aagctatgaa cactaatg 18

10

1

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que se une a CD20 humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo es eficaz para agotar las células B de primate *in vivo*, opcionalmente en donde las células B de primate son humanas, comprendiendo el anticuerpo (a) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia CDR1 de la SEQ ID NO.10, la secuencia CDR2 de la SEQ ID NO.11 y la secuencia de la CDR3 de la SEC ID NO. 12, y los restos del marco de consenso (FR) humano del subgrupo III de la cadena pesada humana (V_{HIII}), en donde la región variable de la cadena pesada comprende además las sustituciones de aminoácidos R71V, N73K y A49G, y (b) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia CDR1 de la SEQ ID NO. 4, la secuencia de la CDR2 de la SEQ ID NO. 5, la secuencia de la CDR3 de la SEC ID NO. 6 y los restos del marco de consenso (FR) humano del subgrupo I de la cadena ligera humana K del subgrupo I (V_{KI}), en donde la región variable de la cadena ligera comprende además la sustitución de aminoácidos L46P.
2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de V_H de SEQ ID NO.8.
3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 2, que comprende además la secuencia V_L de SEQ ID NO.2.
4. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la región V_H se une a una región constante de la cadena de IgG humana, opcionalmente en la que la IgG humana es IgG1 o IgG3.
5. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 3, pero con las sustituciones de aminoácidos D56A y N100A en la cadena H y S92A en la cadena L.
6. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichos anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprenden además una región Fc, en donde dicha región Fc comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejora la actividad ADCC y/o CDC, de manera opcional en donde las sustituciones de aminoácidos son S298A/E333A/K334A; o que comprende además al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que disminuye la actividad CDC, de manera opcional que comprende al menos la sustitución K322A.
7. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones anteriores conjugado con un agente citotóxico, de manera opcional en donde el agente citotóxico es un isótopo radioactivo o una toxina.
8. Un ácido nucleico aislado o un vector de expresión que codifican el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 8, o vectores de expresión que codifican el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno, opcionalmente en donde la célula hospedadora produce el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno y, de manera opcional, en donde la célula hospedadora es una célula CHO.
10. Un método para producir el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cultivar la célula que produce el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 9 y recuperar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno.
11. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente a un paciente que padece la enfermedad autoinmunitaria, de manera opcional en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus sistémico eritematoso (LSE), enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjorgen y glomerulonefritis.
12. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 11, en donde la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple.
13. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 7 para su uso en un método de agotamiento de las células B *in vivo*, comprendiendo el método poner en contacto las células B con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, agotando de esta forma las células B.
14. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de un cáncer positivo para CD20, que comprende administrar una cantidad

terapéuticamente eficaz del agente a un paciente que padece el cáncer, de manera opcional en donde el cáncer positivo para CD20 es un linfoma de células B, leucemia, linfoma no de Hodgkin (LNH), enfermedad de Hodgkin predominante de linfocitos (LPHD), leucemia linfocítica crónica o SLL.

- 5 15. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 14, en donde el cáncer positivo para CD20 es un linfoma de linfocitos B o una leucemia, y el anticuerpo se administra en un intervalo de dosificación de aproximadamente 275-375 mg/m².
- 10 16. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 14, comprendiendo el método además administrar al paciente al menos un agente quimioterapéutico, de manera opcional en donde el cáncer es un linfoma no de Hodgkin (LNH) y el agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y prednisolona.
- 15 17. Uso del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para usar en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente a un paciente que padece la enfermedad autoinmunitaria, de manera opcional en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus sistémico eritematoso (LSE), enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjorgen y glomerulonefritis.
- 20 18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple.
- 25 19. Uso del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para agotar las células B *in vivo*, comprendiendo el método poner en contacto las células B con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, agotando de esta forma las células B.
- 30 20. Uso del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer positivo para CD20, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente a un paciente que padece el cáncer, de manera opcional en donde el cáncer positivo para CD20 es un linfoma de células B o leucemia, de manera opcional en donde el cáncer positivo para CD20 es un linfoma no de Hodgkin (LNH) o una enfermedad de Hodgkin con predominancia de linfocitos (LPHD) y de manera opcional en donde el cáncer es una leucemia linfocítica crónica o SLL.
- 35 21. Uso del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 20, en donde el cáncer positivo para CD20 es un linfoma de linfocitos B o una leucemia y el anticuerpo se administra en un intervalo de dosificación de aproximadamente 275-375 mg/m².
- 40 22. Uso del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 21, comprendiendo el método además administrar al paciente al menos un agente quimioterapéutico, de manera opcional en donde el cáncer es un linfoma no de Hodgkin (LNH) y el agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste
- 45 en doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y prednisolona.

FIG. 1A

Alineación de secuencia del dominio variable de la cadena ligera

2H7	QIVLSQSPAILSASPEKVTMTC [RASSSVS-YMH] WYQQKP * *** ** * * * *
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC [RASSSVS-YMH] WYQQKP * * * * *
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC [RASQISNYLA] WYQQKP
2H7	GSSPKPIY [APSNLAS] GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA ** * * * * *
hu2H7.v16	GKAPKPLIY [APSNLAS] GVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQP * * * * *
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQP
2H7	EDAATYYC [QQWSFNPPT] FGAGTKLELKR * * * * *
hu2H7.v16	EDFATYYC [QQWSFNPPT] FGQGTKVEIKR * * * * *
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIKR

FIG. 2-1
PW4

1 GAATTCACACT TCTCCACT TTGGATAGG .AAATRCAGAC ATGAAAMAATC TCAATGCTGA GTTGTATTT AAGCTGCCCC AAAAAGAAGA AGAGTCGAA
 CTTAAGITGA AGAGGTAGA AACCTATCC TTATGCTG TACTTTTTAG AGTAACGACT CAACAATAA TTGGAAGGG TTTTCTCTCT TCTCAGCTTA
 101 GAACGTGTG CCGAGTAGA AGCTTTGGAG ATTATGCTA CTGCAATGCT TCGATATG GGCBAATG ACCBACAGG GTTGATGAT CAGGTAGAG
 CTTGACACAC GGTCCATCT TCGAACCTC TAAAGCAAT TAAAGCAAT TAAAGCAAT TAAAGCAAT TAAAGCAAT TAAAGCAAT TAAAGCAAT TAAAGCAAT
 201 GGGCCCTGTA CCGAGTAAAG CCGATGCCA GCATTCCTGA CCGAGTAAAG GAGCTGCTG CCGATTCAT AAAGAAGTTA TTGAAGCATC CTCGTGAGTA
 CCGCGGACAT GCTCCATTC GGGCTACGGT CPTAAGGACT GCTGCTATG CTGAGCAGC GCTAATGCA TTTCTTCAT AACTGCTAG GAGCAATCAI
 301 AAAGTTAAT CTTTCACAC CTTGCTAFA AGTTGTCAG CCGGACTT ATAGTGGCTT TGTTTTTAT TTTTATGTA TTTGTAATA GAATTCGAGC
 TTTTCATTA GAAAGTGT CAGNGTAT TCAACAATGC CCGCTCTGAA TATCGCGNA ACAAATAA AAAATTACAT AAACATTGAT CTTAAGCTCG
 401 TCGTACCCG GGGATCCTCT AGAGTTGAG GTGATTTAT GAAAGAAAT ATCGCATTC TCTTCGATC TATGTTGTT TTTCTATTG CTACAAAGC
 AGCCATGGCC CCTTAGGAA TCTCCAACTC CACTAAAHJA CTTTTCTTA TAGCTAAG AAGAAGCTAG ATACAGCHA AAAGAATAAC GAATTTGCG
 1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A
 501 GTACGCTGAT ATCCGATGA CCCAGTCCC GAGCTCCCTG TCCGCTCTG TGGGGTAG GGTCAACATC ACCTGCGAG CCAATCAGG CGGTCCGACT
 CHTGGACTA TAGTCTACT GGTGAGGG CCGAGGGAC ACCCGTATC CCGTGGTAG TGGACGCTC GGTGAGCTC GGCACGCTGA
 22 Y A D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S T
 601 AGCTCTTATA GCTATAGCA CTGGTATCAA CAGAAACCG GAAAGCTAG NTTACTAG CTAGCACT CGAGTGGG GTGCCCTTCT
 TCGAGAAAT CAAATACAT GACCAATGTT GTCTTGGTC CTTTGGAG CTTTGGAG TAAATGAC TAAATGAC GATCGTGG GCTGAGACT CAGGAAAG
 55 S Y S Y M H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y A S N L E S G Y P S R
 701 GCTTCTCTG ATCCGCTCT GGGACGGATT TCACTCTGAC CACTGCTGAC CAGTCCAGC AGACTTCCG AACTTATAC TGTCAACACT CTTGGGTAT
 CCGAGAGACC TAGGCCAAGA CCGTCCCTTA AGTGAAGCTG GTGCTGCTA GAGTGGCTC TCTGAGAG TTAGATATG ACAGTTGTA GAACCCATA
 89 F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y X C Q H S W G I
 801 TCCGCGACA TTTGGCAGG GTCACAGGT GAGATCAAA CCGACTGAG CAGCTGAGT TGTCTCATC TTTCCGCCAT CTGATGACA GTTGAATCT
 AGGCGGCTGT AACCTGCTCC CATGTTCCA CCTCTAGTT CCGTACAC GAGTGGTAG ACGAGATAG AAGGGGTA GACTACTGT CAACCTTAGA
 122 P R T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V P I F P P S D E Q L K S
 901 GGAAGCTGTT CTGTGTGTG CTTGCTGAAJ AACTCTATC CCGAGAGCC CAAAGTACAG TGGAGGTG ATACGCTCT CAAATCGGTT AACTCCAGG
 CTTGAGGNA GACAACAC GAGACTTA TTGAAGAG GGTCTCTCG GTTCAATG CACTTCCAC TATTGGGGA GGTAGGCCA TTGAGGTCC
 155 G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
 1001 AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAGGACA GCACCTACAG ACCCTGACCG CCGTACAGC TCGAAAGC AGACTACAG AAACACAG TCTAGGCTG
 TCTCACAGT TCTGCTCTG TGTCTCTGT CGTGGATG CCGTACAGC ACTGACTCG TGTGATGCT TTTGTTTC AGATGCGAC
 189 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C

FIG. 2-2
PVX

1101 CGAAGTCACC CATCAGGCC TGAGCTGGCC GGTCCAAAG ACCTCAACA GGGGAGGTTG TTAGCTGAT CCTCAGGCC GGAAGCAGTC TGCCCTTAGT
 GCTTCAGTGG GTAGTCCCGG ACTCGAGCGG GCAGTGTTC TCGAGTGTG CCCCTCAC AMTTCGACTA GGNATCCGG CCTCCGTAGC ACCGGATCA
 222 E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C O

1201 ACGCAAGTTC ACGTAAAG GGTATCTAGA GGTAGAGTGG ATTATAGAA AAGAAATATC GAAVTCCTC TTGCATCTAT GTTCGTTTTT TCTATTGCTA
 TGGCTTCAG TGCATTTTTC CCAATAGATCT CCACTCCAC TAAATACTT TTTCCTTAG CSTRAGAGAG AACGTAGATA CAAACAAA AAAATACGAT
 1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T

1301 CAAACGCTA CCGTAGGTT CAGCTGGTGG AGTCTGGCGG TGGCCCTGGT CAGCCAGGG GCTCACTCCG TTGTCTCTGT GCACTTCG GCTACACCTT
 GTTTGGCAT GCGACTCAA GTCGACCAGC TCAGACCGCC ACGGACCCAC GTCGGTCCC CGAGTGGCC PARCAGAGCA CFTCGAGAC CGATGTGGAA
 20 N A Y A E V Q L V E S G G G L V P G G S L R L S C A A S G Y T P

1401 CACCGAATAT ATCATCACT GGGTCCGTC A GGGCCGGGT AAGGGCTGG AATGGGTTC ATCGATNAT CCGTCACTAG ACATCAAGAA CTATACCCAG
 GTGGCTATA TAGTAGTGA CCGAGCAGT CCGGGCCCA TTCCCGGACC TACCCAGCG TAGCTAATA GCACTAGTC TGTAGTGTI GATATTGCTC
 53 T E Y I I H W V R Q A P G K G L E W V A - S I N P D Y D I T N Y N Q

1501 CGCTTCAGG GCGTTTCAC TTAGTCCG CAGGATCCA AAACAGNIT ATACCTGCG ATGACAGCG TCGTGTCTGA GBACTGCC GTCTATATT
 GCGAGTTCC CCGCARRAGT AATTCAGCG CTCTARGGT TTTTGTGAA TTGGAGTTC TACTTGGCG ACGCAGACT CCTGTGCGG CAGATATAA
 86 R F K G R F T I S R D D S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C

1601 GTGCTGATG GATCAGCAT TTCTTGACT ACTGGGTTCA AGRACCTTG GTCACCTCT CCTGGCCTC CACCAAGGGC CAACTGGTCT TCCCCCTGGC
 CAGAGCTAC CTAGTCCGA AAGAGCTGA TGACCCCHGT TCTTGGGAC CCGAGGACC AGTTCCTGAT GAAGGCTT GGCACCTCC ACAGCACTT GAGTCCCG
 120 A R W I S D F F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A

1701 ACCCTCTCC AAGAGACT CTGGGGCNC ACGGGCCCTG GCTGCTCTG TCAGAGACTA CTTCGCCGAA CCGGTGACGG TGTCTGAGAA CTCAGCGCC
 TGGGAGAGG TTCTGTGGA GRACCCCGTG TCGCCGAGC CCGAGGACC AGTTCCTGAT GAAGGCTT GGCACCTCC ACAGCACTT GAGTCCCG
 153 P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A

1801 CTGACAGG GGTGACAC CTTCGGCT GTCTACAGT CCTCAGACT CTACTCCCTC AGCAGCTGG TGACCTGCC CTCCAGAGC TTGGGCAACC
 GACTGTGG CCGAGCTG GAGGGCCGA CAGGATGCA GGGTCTGTA GATGAGGGG TCGTGGCAC ACTGGCAGG GAGTCTGCG AACCCTGG
 186 L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y . S L S S V V T V P S S L G T Q

1901 AGACTACAT CTGACAGT ANTCAGC CAGCGACAC CAGGTGAC AGRAGTTG AGCCGATC TTGTACAAA ACTCACAT GACCAACGCA
 TCTGGATGTA GACTTGCAC TTAGTGTGG GGTGTGTG GTTCACCTG TTCTTCAAC TCGGTTTAG AACACTGTT TTAGTGTGTA CTGGTGGCGT
 220 T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T O

2001 TGCACAGTA TGTCCATC CGACAGATC GCGGTCACT ATGGGCTGT GCTAGGCGG CCGTACTACT TGTCTGCTC CCGCGGTTC GTCCGGGTGC
 ACGTGGTCAI ACGAGTTRAG GCTGTCTG CCGTCTGTA TACCGCAGA CAGTCCGGC GGGATATGTA ACAGAGAGG GGGCCCAACG CAGCCCAACG

2101 ATGGAGCCGG CCGACTCGA CTTGATGGA AGCCGGGCGC ACCTGCTAA CCGATCAC ACTCAGGAA ITGGAGCNA TCAATCTTG CGGAGAACTG
 TACCTCGGCC CCGTGGAGCT GGACTTACT TCGGCCCGCG TGGAGCGAAT GCTAAGTGG TGGGTTCTT AACTCGGTT AGTTRAGAC GCTCTTRAC

2201 TGAATGGCA AACCACCT TGGAGAAC TATCCATGG GTCCGCGATC TCCAGAGCC GCGAGCGGGC CACTTGGGG CACTTGGGGT CCTGGCCAG
 ACTTAGCGGT TTGGTTGGA ACCGCTTGT ATAGTAGAG CAGCGTTCGG CDTGCCCGC GTAGAGCCCG TCGCAACCCA GSAACCGTGC

FIG. 2-3
FVX4

2301 GGTGGCAGTGT ATGTGCTCC TGTGTTGAG GACCGGCTA GGTGGGGGG ATGTGATCAC AGATGATCAC CGATACGGGA GCGAAGCTGA
 CCACGGTAC TAGCAGGAG ACAGCACTC CTGGCCCAT CCGACCGCC CACCGGATG TTAATGCTG GCTATGCTG CCGTTCGCT CCGTTCGCT

2401 AGCGACTGCT GCTGCAABG GTCGCGACC TCGACACAA CAGAAATGT CTTGGGTTT CAGTGTTCG AAAGTCTGGA AAGCGGAG TCGCGCCCT
 TCGCTGACG CAGGTTTTC CAGAGCTGG ACTGTGTTT GTACTTACCA GAGCCAAAG TTTCAGACT TTGGGCTTC AGTCGGGGG

2501 GCACATAT GTTCCGATC TGCATGCGG GATCTGCTG GCTACCTGT GBAACACTA CACTGTAT ATCGAAGCC TGGCATGTAC CTTGAGTAT
 CTTGTTAATA CAGGCTTAG ACATAGCTC CTACGACAC CAGTGGACA CTTGTGGAT GTAGACATA TTGCTTCCG ACCGTACTG GACTACTA

2601 TTTTCTCTGG TCCCGCCGA TCCATACCG CAGTGTGTTA CCTCAACAC GTTCCAGTA CCGGGCATG TCATCATCAG TAACCCGTAT CGTGACATC
 AAAAGAGCC AGGGGGGCT AGGTATGGG GTCAACAAAT GGGATGTTG CAGGTCAAT GGGCCCTACA AGTGTAGTC ATTGGGATA GCACTGTTG

2701 CTCTCTGTT TCATCGGTAT CATACCCCC ATGAACAGAA ATTCCCTTT ACAGGAGGC ATCAGTGCAC CAAACAGGA AAAACCGCCC TTAACATGGC
 GAGAGCMA ASTRGCCAIA GTAATGGGG TACTTGTCTT TAAGGGGAA TGTGCTCCG TAGTTCACTG GTTTGTCTTT TTTTGGGGG AATTGTACCG

2801 CCGCTTATC AGAAGCCAGA CATTACGCT TCTGAGAAA CTCACAGAC TGGAGGGGA GACATCTGT AATGCTTCA CGACCAAGCT
 GCGGAATAG TCTTGGTCT GTATTTCGA AGACTCTTT GAGTGTCTG ACCTGGCCCT ACTGTCCCT CTGTAGACAC TTAGCCAGT CCTGTGGGA

2901 GATGACTTT ACCCGCAT CCGGAATG TAAAGTAA TATTGTTA AAATGGCT TAAATTTG TTAATCAGC TCAATTTTA ACCAATGGC
 CTACTGAAA TGGCTGTA TAITTAGTIT TCTTACTGG CTCATCCCA ACTCACACA AGTCCABACC TTGTTCTCG GTGATATTT TTGCACTG

3001 GAAATCGGC AAATTCCTT ATAAATCAA AGAATGACC GAGTATGGT TGGTGTGTT TCCAGTTGG AACAGAGTC CACTTATTA GAACTGGAC
 GCTTTAGCC TTTTAGGGA TAITTAGTIT TCTTACTGG CTCATCCCA ACTCACACA AGTCCABACC TTGTTCTCG GTGATATTT TTGCACTG

3101 TCCAGGTTCA AAGGGGAAA AACCTCTAT CAGGCTATG GCGCTACG TGAACATCA CCTAATCA GTTTTTGG GTGAGGTGC CFTAAAGCA
 AGTTGCAAT TTCCCGCTT TTGGCAGTA ATTCGACAC TCCCGCTTC GCGCTTGC ACCGCTTT CTTCCCTTC TTGCGTTTC CTGCGGGCC

3201 TAAATCGGA CCTAAAGG AGCCCGAT TTAGACTTG ACGGGGAG CCGGGGAGG TGGCGGAAA TGGCGGAAA AAGCGGAAA GAGCGGAAA GAGCGGAAA
 ATTTAGCCTT GGGATTTCC TGGGGGCTA AATTCGAC TCCCGCTTC GCGCTTGC ACCGCTTT CTTCCCTTC TTGCGTTTC CTGCGGGCC

3301 TAGGGGCTG GCNAGTAT CCGTCAAGT CCGCTAAC ACCACCCCG CCGGGCTTA CAGGGGCGT CCGCATCTG CCTCGCGCT CCGCGCGT
 ATCCCGAC CTTTCAATC CCGAGTCCG CCGCATGG TGTGTGGG GCGGGGAT ACGGGCGAT GTCCCGCA GCGGTAGAC GAGCGCGCA

3401 TTCGTGATG ACGGTGAAA CCTCTGAC ATGCACTCC CAGAGCGGT CACAGCTGT CFTAAAGG ATGCGGGGAG CAGCAAGCC CFTCAGGGC
 AAGCCCTAC TCCACTTTT GAGACTGTT TAGTCCAG GCTCTGCA GTGTGCAACA GACTTCGC TACGGCCCTC GTCTGTGG GCAGTCCCG

3501 CGTGAGGGG TGTGGGGG TGTGGGGG CAGCCATAC CCGTCACT GAGTGTATC TGGCTTACT ATGGGCATC AGACAGAT
 CCAATGCGCC ACMACCGCC ACAGCCCGC GTGGTACTG GGTCTGTC TGGTATGC CTGCAATG ACCGATTA TACCGCTAG TCTGCTTA

3601 GTACTGAG TGCACATAT CCGGTGAAA ATACCGACA CCGATAC CCGATAC CCGATAC CCGATAC CCGATAC CCGATAC CCGATAC CCGATAC
 CATGACTTC ACGTGTATA CCGCATTT TATGCGTGT GTAGCTAG GAGTATGC TGGTATGC TGGTATGC TGGTATGC TGGTATGC TGGTATGC

3701 TGGCTGCT GGTGGGCT GCGGGAGG TATCAGTCA CFTAAAGG GTAAATCGGT TATCCACA ATCAGGGGAT AACCGGAA AGACATGT
 ACGGAGCCA GCGAGCCAC CCGCTCCG ATAGTCCAGT GAGTGTCT TAGTCCCTA TAGTCCCTA TAGTCCCTA TAGTCCCTA TAGTCCCTA

FIG. 2-4
PVZ4

3801 AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAGAGCC GGTGTGCTGG GTTTTTCGA TAGGTCGGC CCCCTGAGC AGCAGTCCAG ABAATCGAGC
 TCGTTTCCG GTCGTTTTCC GGTCTGTGCG ATTTTTCGG CCGACAGCC GCAAAAGGT ATCCBAGGG GGGGGACTGC TCGTAGTGT TTTAGCTGGC

3901 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTAAAGAT ACGAGGGGT TCCCCCTGGA AGCTCCCTGG TGGCTCTCC TGTTCGGACC CTGGCGGTTA
 AGTTCAGTCT CCACGGCTTT GGGCTGTGCT GATTTTCTA TGGTCCGCAA AGGGGAGCT TCGAGGGAGC ACGCGAGAG ACAAGGCTGG GAGCGCGAAT

4001 CCGGATACCT GTCCGCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAT AGCTCACCT GTAGTATCT CAGTTGGTGG TAGGTGCTTC GCTCCAGCT
 GGCCTATGGA CAGCGCGAAA GAGGGAAGCC CTTCGACCG CGAAAGAT. TCGAGTCCGA CATCCATAGA GTCAAAGCCAC ATCCAGCAAG CGAGGTTGGA

4101 GGGCTGTGG CACGAAACCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GTAACTATGG TCTTGGTCC AACCCGGTAA GACAGACTT ATCGCCACTG
 CCGACACAC GTGCTTGGGG GGCAGTCCG GCTGGCGAGC CGAAATAGC CAATGATAGC AGNACTCAGS TGGGGCCATT CTGTCTGGA TAGCGGTGAC

4201 GCAGCAGCCA CTGGTACAG GATTAGCAGA GGGAGTATG TGGCGGTGC TACAGATTC TGAAGTGGT GGCCTAACCTA CGGCTACACT AGAAGGACAG
 GCTGCTGGT GACCATGTC CTAACTGTC CACTCCATAC ATCCGCGCAG ATGTCTCAG AACTCAACA CCGGATGAT CGCGATGTA TCTTCCCTGC

4301 TATTGGTAT CTGGCTCTG CTGAGCCAG TTACTTCGG AAAAGATTT GSNCTCTT GATCCGGCA ACAACCCACC GCTGGTAGC GTGGTTTTT
 ATAAACCATTA GAGCGAGAC GACTTCGGTC AATGGAGCC TTTTCTCAA CMTGAGAA CTAGGCGGTT TGTGGTGG CAGCCCTGC CACCAAAJAA

4401 TGTTCGAAG CAGCAGATTA CCGCAGAAA AAAAGATCT CAGAGATC CTTCATCTT TTCTAGGGG TCTGAGCTC AGTGGAGCA AAKCTCACT
 ACAAAAGTTC GTGCTCAT AT GCGCTCTT TTTTCTAGA GTTCTTCAG GAACCTAGA AAGATGCCCC AGATGCGAG TACCTTCTT ITTGGTGGCA

4501 TAGGGATTT TGGTATGAG ATATCAAAA AGGATCTCA CCTGATCTT TTAATATTA AATGAGATTT TAAATCAAT CTAAAGTATA TATGATGAA
 ATTCCCTAAA ACCAGTACT TAAATGTTTT TCTTAGAAT GTATCTGSA AATTTAATT TTTACTTCAA AATTGATTA GATTCATAT ATACTCATTT

4601 CTGGTCTGA CAGTTACCA TGCCTATCA GTAGGACAC TACTCGGG AICTGTAT TTGCTGATC CATAGTCCC TACTTCCCCT TCGTGTGAT
 GAACAGACT GTCAATGTT ACGAATGAT CACTCGGTGG ATAGTGTGC TACACAGATA AAGCAAGTAG GTATCAACGG ACTGAGGGGC AGCAGATCTA

4701 AACTACGATA CGGGAGGCT TACCATCTGG CCCAGTCT GCAATGATC CCGAGACC AGCTCACCG GCTCCAGAT TATCAGCAAT'AAACAGCCA
 TTGATGCTAT GCCCTCCGA ATGGTAGCC GGGGTACGA CATTCTATG GCGCTTGGG TCGAGTGGC CAGGTCTTA ATGTTGCTTA TTTGGTGGT

4801 CCGGAGGG CCGAGCCAG AAGTGTCTT GCAATTTAT CCGCTCCAT CCAGTCTAT AATTGTGCC GGGAGCTAG AGTAGTAGT TCGCCAGITA
 CCGCTTCCC GGTCTCGTC TTCACAGGA CATTGAAATA GCGGAGGTA GGTCTGATA TTRACACCG CCTTGTGATC TCAITCATCA AGCGTCAAT

4901 ATAGTTTGG CAGCTTGTT GCGATGCTG CAGGATGCT GGTGCAAGC GTCCCTAGCA CCAAGTGG CCAAGTGG TAAGTGGAG CCAAGGTTG CTAGTTCGG
 TATCAAAAGC GTTCACACA CAGTAAAGC GTCCCTAGCA CCAAGTGG CCAAGTGG TAAGTGGAG CCAAGGTTG CTAGTTCGG

5001 AGTTACATGA TCCCCATGT TGTCCMAAA AGCGGTGAG TCTTGGTGC TCGGHTGCT TGTCAAGAT AAGTGGCCG CAGGTGTAC ACTCATGTT
 TCAATGACT AGGGGTACA ACACTTTT TCGCCATCG AAGAACAG GAGGCTAGA CAGTCTTCA TTGAAACCGC GTCAAGATG TGAATACAA

5101 ATGGCAGCAC TGCATAATC TCTTACTGC ATGCCATCC TAGATGCTT TTCTGACT GGTGACT CAACAGTC AATCTGAGAA TAGGTATAGC
 TACCCTGAG ACATATAAG AAGATGACAG TACGGTAGC GTCCCTAGCA CCAAGTGG CCAAGTGG TAAGTGGAG CCAAGGTTG CTAGTTCGG

5201 GGGCAGCAG TTCTCTTGC CCGGCTCAA CAGCGGATA TACCGGCCA CATAGAGAA CTTHAAAGT GCTCATCATT GGAAGAGTT CTTCGGGGC
 CCGCTGGCTC AACGAGAAC GCGCCGAGTT GTCCCTATT ATGGCGGCT STATCTCTT GAATTTTCA CAGTAGTAA CTTTTTCAA GAGGCCCGC

FIG. 2-5
PVX4

5301 AAAAACTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTARACCA CTCGTGCACC CAACCTGATCT TCRGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTTCT
 TTTTGAGAGT TCCTAGAATG GCGACAATC TAGSTCAAGC TACATTGGGT GAGCACGTGG GTTGRACTRGA AGTCGTGHA ATCGAAGTG CTCGCCAAGA

5401 GGGTGAACAA AACACAGGAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAAATAGGG GACACGGAAA TGTGAAATAC TCRFACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA
 CCCACTCGTT TTTGTCCCTC GGTTTTACGG CGTTTTTTC CTATTCCCG CTGTGCCCTT ACRACCTATG AGTATGAGAA GGAANAAGTT AATAATACTT

5501 GCATTATCA GGGTATTGT CTCATGAGCG GATACAUHT TGAATGTRTT TGAANAATA ACAAATAGG GGTTCGGCGC ACATTCCCG GAAAAGTGCC
 CGTAAATAGT CCCAATAACA GAGTACTGCG CTATGTATTA ACTTACTATA ATCTTTTAT TTGTTATCC CCAAGGCGCG TGTAAAGGGG CTTTTACGG

5601 ACCTGACGC TAGRAACCA TTATTATCAT GACATTACG TATAAATA GGGTATCAC GAGGCCCTT CGTCTTCBA
 TGGACTGCAG ATTCTTTGGT AAATAAAGTA CTGTAAATGG ATATTTTAT CCGCATAGTG CTCGGGAAA GCAGAAGTT

FIG 3-1

PZH7.chim6.8

1 GAATTCACCT TCTCCACTT TTGGATGAG AATACACAG ATGMAAATC TCATTCCTA GTGTATTT AAGCTGCCC AAAAAGA AGAGTCGAAT
 CTTAAAGTGA AGAGGTATGA AACCTATCC TTATGCTG TACTTTTAG AATACACCT CACAAATTA TCGARCCGG TTTTCTCTCT TCTAGCTTA

101 GAATCTGTG CCGAGGTAGA AGCTTTGGG ATTATCGTA CTGCAATGCT TCGCAATAG CCGCAAAATG ACCAACACCG GTTGAATGAT CAGGTAGAGG
 CTTCACACAC CCGTCCACTT TCGAAACCTC TAAATAGCAGT GACGTATAGA AGGTTATAC CCGTTTAC TGGTTGTCG CAACTACTA GTCCATCTCC

201 GGGGGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATCCA CCAATTCCTA CAGCATACG GAGTGTCTC CCGATTAAGT AAAGAAGTGA TTGAAGCATC CTCGTACGTA
 CCGCGCACT CTTCCACTT CCGGTACGGT CGTAAGCACT CTTCTATGCT CTGACACAG CCGTAACTT TTTTATAT TTTTAAATGA TTTTAACTA GAATTCGAGC
 TTTTCAATTA GMAAATTTT CAGCATAT TCAACAGTGC CCGCTCTGAA TATCAGCGAA ACAAAATTA AAAATTAATCAT AAAATTAATCAT CTTAGCTCG

301 AAAGTATAT CTTTTCACA CTTCTCATGA AGTTGTCAG CCGAGACTT AATGTCGCT TTTTTTAT TTTTAAATGA TTTTAACTA GAATTCGAGC
 TTTTCAATTA GMAAATTTT CAGCATAT TCAACAGTGC CCGCTCTGAA TATCAGCGAA ACAAAATTA AAAATTAATCAT AAAATTAATCAT CTTAGCTCG

401 TCGGTACCCG GGGATCTCT AGAGTTGAG GTGATTTAG AAAAAGATA TCGCATTTCT TCTGCACT ANGTGCTTT TTTTATGCT TACAACGGG
 AGCCATGGGC CCCTAGAGA TCTCCACTC CACTAATAT TTTTCTTAT AGCTAATGA AGAATCTAGA TACAACAAA AAAATTAATCAT ATGTTTGGC
 1 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A

501 TAGCTCAGA TAGTACTGTC CAGTCCCGG CTAATCTGT CCGCTCTCC TGGCAGAGG GTCACTATGA CCTCAGAGC CAGTCTTCT GTAGCTATA
 ATGCGATCT ATCATGACAG GGTGAGGGC CGATGACGA GGGCGAGG ACCGCTTTC CAGTATACT GAGCTCTCG GTGAGAGGA CACTCGATAT
 22 Y A Q I V L S Q S P A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M

601 TGCATTGGTA TCAACAGAA CCGAGAGCT CTCGAAACC ATGGATTTAC GTCATCGA ACCTGGCTC TGGATCCCT GCGGCTTCT CTGGATCCG
 ACCTAACCAT AGTTGCTTT GGTCTTGA GAGCTTTG TACTTAATG CAGATAGCT TGGAGCCAG ACCTCAGGA CCGCAGGA GACCTAGGCC
 56 H W Y Q Q X P G S S P K P W I Y A P S N L A S G V P A R F S G S G

701 TTTGGGACT AGTACTCTC TGACATCAG CAGATGGAG CCGCACTTA TTACTTCAA CAGTGGAGT TCAATCCGCC CACATTTGA
 AAGNCCCTGA TCATGAGAG ACTGTAGTC GTCTACCTC GGTCTTCTC GGGTTGAT AATGCAATTT GTACCTCGA AGTTAGCCGG GTGTAACTI
 89 S G T S Y S L T I S R V E A E D A A T Y Y C Q Q W S F N P P T F G

801 GCGGACCA AGCTGGACT CAAAGCACT GTGGTGCAC CAATCTCTT CACTTCCCG CCATCTGAG AGCAGTTGA ATCTGCACT GCTTCTTTG
 CCGCCGTGT TCGACTCGA GTTTGCTTGA CACCGAGTG GTAGAGGCC GTAGACTAC TCGTCACTT TAGACCTTGA CGAGCAAC
 122 A G T K L E L K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V

901 TGTGCTGCT GATRACTC TATCCAGAG AGGCCAAGT ACAGTGGAG GTGATAGG CCGTCCATC GGTACTCC CAGGAGTG TCAACAGCA
 ACAAGCA CTTATGAG ATAGGCTC TCGGTTCA TGTCACTTC CACTATTC CCGATTCG GGGAGTTAG CCGATTCG GTCTCTCAC AGTGTCTGT
 156 C L L N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q

1001 GAGACAGAG CAGCACTT ACAGCTCAG CAGCACCCTG ACAGTANGA AAGCACTA CAGAAACAC AAAGTCTAG CCGTCCAGT CACCCATG
 CCTGCTTC CTGCTGGA TGTGGATC GTGTGGAC TGGACTGT TGTCTGAT GCTCTTGT TTTCAATC GAGCCTTCA GTGGTATG
 189 D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q

FIG. 3-2
PZH7.chim6.8

1101 GGCCTGAGCT CGCCCTCAC AARAGCTTC AARGGGGAG AGTGTAAAG TGAATCTCTA CGCCGGAGC ATCGTGGCCC TAGTACGCCAA GTTCAACGTAA
 CCGGACTCGA GCGGGCAGTG TTCTCGAAG TTGTCCCTC TCACAAATTC ACTAGGAGAT CGGGCTGCG TAGCACCGGG ATCAATGGGTT CAAATGGCAAT
 222 G L S S P V T K S F N R G E C O
 1201 AARAGGATC TAGAGTTGA GGTGATTTA TGAARAAGA ATCGCATTT CTCTTGCAI CTATGTTGTT TTTTCTAT GCTACAAAG CGTACGGTCA
 TTTCCCATAG ATCTCCACT CCAATAAAT ACTTTTCTT ATAGGTAAA GAAAGATTA GATACAGCA AABAAGTA CAAATTTGCG GCATGGAGT
 1 M K K N I A F L L A S H F V F S I A T T N A Y A Q
 1301 GGCTTATCTG CAGCAGTCTG GCGCCGAGCT GGTGCGGCCA GAGCTAGCG TCAAGATGTC CTGTAAAGCT TCTGGCTACA CCTTACCAG CTATAACATG
 CCGAATAGAC GTGCTCAGAC CCGGCTCGA CCACGCGGTT CCTCGATCC AGTCTACAG GACATTTGCA AGACCGAGT GGAATGCTC GATATTGTAC
 25 A Y L Q Q S G A E L V R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y N M
 1401 CAITGGTCA AGCAGCAC GAGGCHAGC CTGGAATGA TTGGGCGAT CTATCTGCG CAGCGGACA CGAGCATTA CCGAAGTTC AAGGCGRAGG
 GTAACCCAGT TCGTCTGTTG CTCCGTTCCG GACTTACT AACCTGCTA GATAGAGCG TTGCGCTGT GCTGGTATT GGTCTCAG TCCCGTTC
 58 H W V K Q T P R Q G L E W I G A I Y P G N G D T S Y N Q K P K G K A
 1501 CCACTCTGAC TTGGACAG TCCAGAGTA CTGCTACAT GCACTGAGC AGCTGACTT CTGAGACAG CGCTGTCTAC TTTTGTCTC GCGTGGTCTA
 GGTGAGACTG ACACCTGTC AGTGTGCAI GAGGATGA GGTGACTCG TGGACTGA GACTCTGTC GGCACAGT GAAACAGNG CACACAGAT
 92 T L T V D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y F C A R V V Y
 1601 CTATAGCAC AGCTACTGCT ACTTGGAGCT GTGGGTACC GGAACACAG TCACCGTCTC CTGGCCCTCC ACCAAGGACC CATCGTCTT CCCCCTGGCA
 GATATGTTG TCGATGACA TGAAGTCA GACCCATGG CCTTGTGTC AGTGGCAGG GAGCCGAGG TGGTTCGCG GTAGCCAGAA GGGGACCGT
 125 Y S N S Y M Y F D V W G T G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A
 1701 CCCTCTCCA AGACACCTC TGGGGCACA GGGGCCCTGG GCTGCTGGT CMAAGTAC TTCCCAGAAC CGGTGAGGTT GTCTGGGAC TCAGGCGCCC
 GGGAGAGT TCTGTGGAG ACCCGTGT CCGCGGACC CGAGGACCA GTTCTGATG AAGGGCTTG GCCACTGCA CAGCACTTG AGTCCGCGG
 158 P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L
 1801 TGACACGCG CGTGCACAC TTCCCGGCTG TCTACAGTC CTACCTCA TACTCCCTCA GCAGGTTGTT GACCGTCCC TCCAGCAGCT TGGGACCCCA
 ACTGGTCCC GCAGTGTG AAGGGCCGAC AGGATGTCG GATGCTGAG ATGAGGAGT CGTGCACCA CTGGCAGGG AGTCTGCGA ACCCGTGGT
 192 T S G V H T P P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S L G T Q
 1901 GACTACATC TGCACGTTGA ATCAGAGCC CAGCACACC AAGTGGACA AGAAGTTGA GCCCAATCT TGTACAAA CTCACATG ACCACCGCAT
 CTGGATGAG ACCTTCACT TAGTTCGG GTGTTGAG TTCCACTGT TCTTCACT TCCTTCACT CGGTTTGA ACACTGTTT GATGTGTAC TGGTGGGTA
 225 T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T O
 2001 GCACAGTAT CTTCCATTC GACGATCG CCAATCACTA TGGGTTGCTG CTAGCGCGC CTATACCTT GTCTGCTCC CCGGTTGCG TCGGGTGC
 CGTGGTATA GCAAGTAGG CTGTGTHAG GGTGATGAT ACCGACAC GATCGGCG GATHTGAA CAGCGGNG GGCACAGC AGCCACAGT
 2101 TGGAGCCGG CCACTCGAC TGAATGGA GCCGGCGGCA CCTGCTAAC GATTCACCA CTCAGAAAT TGGAGCCAT CAACTTTC GGAAGACTGT
 ACCTCGGCC GGTGGAGCT GACTTACCTT CCGCGCGGTT CTAAGGATG CTAAGGATG GAGTTCTTA ACCCTGGTTA GTTAGAAGC CCTCTTGACA
 2201 GAATGGCAA ACCACCTT GGCAGACAT ATCCATGCG TCCGCACT CAGCAGCGG AFTCGGGCA GCGTGGGTC CTGGCCACGG
 CTTACCGT TTGTTGGNA CCGTCTGTA TAGTGGCC AGCGGTTAGA GGTCTGCGC GTGCGCGCG TAGAGCCCGT GGCACCCCG GACCGGTGCC

FIG. 3-3
PZH7.chim6.8

2301 GTCCGCATGA TCGTCTCTCT GTCGTTGAG ACCCGGCTAG GCTGGGSSG TSCCTTACT GATTAGCAGA ATGATATACC GATAGCGGAG CGAAGGTGAA
CACGGTACT AGCAGAGGA CAGCACTCC TGGGCCGATC CGACCGCCC AAGGAAAGA CAACTGCTT TACTTAGTGG CTATGGCTC GCTTGCCTT.

2401 GCGATGCTG CTGCAAAAG TCTGGGACT GAGCAACAC ATGAAATGTC TTGGTTTCC GTGTTTGTG AAGTCTGGAA AGCGGAGAT CAGCGCCCTG
CGCTGACGAC GAGTTTTC AGACGCTGA CTGTTTGTG TACTTACAG AAGCCAAAG CACAAAGCAT TTCAGACCTT TCGCCCTTCA GTCCGGGRC

2501 CACCAATRG TTCGGATCT GATCGCAGG ATGCTGCTGG CACCCCTG GACACTAC ACCTGATTA ACGAAGCGCT GGCATAGACC CTGAGTGAAT
GTGGTAATAC AAGGCCTAGA CBTAGCTCC TACGACGACC GATGGACAC CTTGTGGATG TAGACTAAT TCGTTGCGA CGGTAACTGG GACTCACTAA

2601 TTCTCTGCT CCGCCGCAAT CCAACGCC AGTTGTTTAC CCTCACAAG TTCAGTAC CGGGCTGTT CATCATGAT ACCCGGTATC GTAGGCAATCC
AAGAGACCA GGGCGGCTA GGTATGGCG TCAAAATG GAGTGTTC AGGTCTATG GCCCTACAA GTAGTATGCA TTGGGCATAG CACTCGTAG

2701 TCTCTGTTT CATCGTATC ATTACCCCA TGRACAGAA TTCCCCCTTA CACGAGCA TCAAGTACC AACAGGAA AACCGCCCT TAACATGSCC
AGAGCABA GTAGCCNAG TATGGGGT ACTGTCTTT AAGGGGMAI GTCCCTCGT AGTCACTAG TTGTCTTT TTGGCGGA ATTTACCGG

2801 CGCTTTATCA GAAGCCAGAC ATTAAGCCTT CTGGAGAAC TCAACAGCT GAGCGGAT GACAGCGAG ACATCTGTA ATCGCTTAC GACCACGCTG
GCGAATAGT CTTGGTCTG TANTGCGAA GACCTTTG AGTTGCTGA CTTGGCCTA CTTGTGCTC TGTAGACT. TAGCGRAGT CTGGTGGRC

2901 ATGAGCTTGA CCGAGCAT CCGAAATGT AAGCTAAT ATTTGTTAA ATTTGCTT AATTTGT TAAATCAGCT CATTTTTTA CCAATAGGCC
TACTCGAAT GCGTCTGAG GCCTTACA TTGCAATA TAAACAAAT TTAGCCGA ATTAGTGA ATTAATAAT GGTATCCGG

3001 GAAATCGCA AATCCCTTA TAAATCAAA GAATGACCG AGATAGGGT GATGTTGT CAGTTTGA ACGAGTCC ACTATTAG AACGTGACT
CTTAGCGT TTAGGAAI ATTAGTTTT CTATCTGCC TCAATGCCA CTCACANA GGTCAACT TGTCTCAG TGTATAATTC TTGCACCTGA

3101 CBAAGTCA AGGGCABA ACCGTATC AGGCTATG TCCGENTACC GGTGTATGA CTTGTATG GATTAGTTC AAAAAACCC AGCTCCACGG CATTTGTGA
GGTTCNGTT TCCGCTTT TGGCAGTAG TCCGENTACC GGTGTATGA CTTGTATG GATTAGTTC AAAAAACCC AGCTCCACGG CATTTGTGA

3201 AATTCGAC CTPAAGGA GCCCGGAT TAGACTTGA CGGGAAAG CCGCAAGT GCGGAAG AAGCGAAG AAGCGAAG AAGCGAAG AAGCGAAG AAGCGAAG
TTTAGCTTG GATTTCCCT CAGGGCTNA ATCTGAACT GCCCTTTG CCGCTTGA CCGCTTTC CTCCCTTCT TTCCCTTTC TGCCCGGA

3301 AGGGCCCTG CAAGTATG GCTACGCTG CCGTAAAC CACACCCG CCGCTTAA GCGCGCTAC AGCGCGCT CCGATTCCTG CTCGGCGTT
TCCCGGACC GTTCACTG CCAATGAG GCGAATGTT GGTGTGGGG GCGCAATTA CCGCGCATG TCCCGCGAG CCGTAGGAG CAGCGCGCA

3401 TCGGTATGA CCGTAAAC CTCTACACA TCGACTCC GAGAGGCTC AAGTGTTC GTTAGCGGA TCCCGGAG ACAAAGCC GTAGGCGG
AGCCACT GCACTTTG GAGCTGTGT AGTGGAGG CCTCTGAGG TGTGACAG AATTTGCT AGCGCCCTG TCTGTGGG CAGTCCCGG

3501 GTCAAGGCT GTTGGCGGT GTCGGGCG AGCATGAC CAGTCACTA CCGTAGCG AGTGTACT GCTTACTA TCGCGCATCA GAGCAGATG
CACTGCCA CAACGCCA CAGCCCGG TCGTACTG GTAGTGTAT CCGTATGCC TCAATGA CCGAATGAT AGCCGTTCT CTGCTTAC

3601 TACTGAGT GCACATAG CCGTGTGAAA TACCCACAG ATCGTAGG AGAATACC GCATCAGCG CTCTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTGCT
ATGACTTCA CBTGTATAC GCCACATTT ATGGCTGTC TACGATTC TCTTTATG CBTGTATG GAGAGCGA AGGAGCGAT GACTGAGCA

3701 GCGCTGCTC GTTCGCTG GCGAGCGGT ATCAGCTAC TCAAGCGG TAAATGGT ATCCACAGA TCGGGGATA AGCCAGAA GACATGTGA
CGGAGCCAG CAAGCGAG CCGCTGCCA TAGTCAAGT AGTTCCCG AATATGCCA TAGTGTCT AGTCCCTAT TCGTCTCTT CTGTACT

FIG. 3-4
PZH7.chim6.8

3801 GCMAAGGCC AGCAAAAGGC CAGAACCGT AAAAAAGCG CGTGTCTGGC GTTTTCCAT AGCTCGGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGAGGCT
CGTTTTCCCG TCGTTTTCCG GTCTTTGGCA TTTTCCGGC GCACGACCC CAAAAGGTA TCCGAGCGG GGGGACTGCT CGTAGTGTTT TTAGCTGGCA

3901 CAGTCHGAG GTGGCAAA CCGACGGAC TATAAGATA CCAGCGTTTT CCCCTGGAA CTCCCTGCT GCGCTGCT GTTCCGACCC TCGCGCTTAC
GTTGAGTCT CACGCTTTG GCGTCTCTG AATTTCTAT GTTCCGCAA GGGGACTT CGAGGACG CCGGAGGGA CAAGGCTGGG ACCGGMATG

4001 CGGATACCTG TCCGCTTTC TCCCTTCGG AGCGTGGG CTTTCTA GCTCAGCTG TAGTATCT AGTTCGGT AGTTCGGT TCCAGACTG CTCCAGCTG
GCCTATGGAC AGCGGAAAG AGGAAAGCCC TTCCGACCG GAAAGATAT CGATCGAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAGC GAGGTTGAC

4101 GCGTGTGTC ACGAACCCC GATTACGCC GACCCCTGG CCTTATCGG TACTATCGT CTGAGTCCA ACCCGGTAG ACAGACTTA TCGCCACTGG
CCGACACCG TGCTTGGGG GCAATGCGG GATGAGGCC GGNATAGCC GAGTCTGCT TGAAGTGTG GCTTACTAC GGCATACCTA GAAGGACAGT
GTCTCGGTG ACCAATGTCC TAATGCTC GCTCCATCA TCCGCCAGA TGCTCAGA ACTTCACAC CGGATGAG CGGATGAT CTTCCTGTCA

4201 CAGCAGCCAC TGGTACAGG ATTACGAG CGAGTATGT AGGCGTGT ACAGTCTCT TGAAGTGTG GCTTACTAC GGCATACCTA GAAGGACAGT
GTCGTCGGT ACCAATGTCC TAATGCTC GCTCCATCA TCCGCCAGA TGCTCAGA ACTTCACAC CGGATGAG CGGATGAT CTTCCTGTCA

4301 ATTGATATC TCGGCTCTG TGAACCGAGT TACTTCCGA AAAAGGTTG GTAGCTTTG ATCGGCAA CAAACACCG CTGCTAGCGG TCGTTTTTTT
TAAACCATAG ACGCGAGAG ACTTCGCTCA ATGGAAGCT TTTTCTCAC CATCGAAC TGGCGGTT GTTGTGGC GACCATGCC ACCMAAAA

4401 GTTTCRAGC AGCAGTTAC GCGGAAA AAAAGATCT AAGAGATCC TTGATCTTT TCTAGGGGT CTGAGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT
CAACGTTG TGTCTAATG CCGCTTTTT TTCTTAGG AACTAGAAA AGATSCCCA GACTGGAGT CACTTGTCT TTGATGCAA

4501 AAGGATTT GGTATGAA TTATCABAA GATCTTAC CTRGCTCT TTAMTTAA AATGATTT TAATCAATC TAATGATAT ATGATTAAC
TTCCCTAAA CAGTACTCT AATGTTTT CCTGAGTG GATCTAGAA AATTAATTT TTACTCAA ATTAGTTAG ATTTCATATA TACTCATTTG

4601 TTGGTCTGAC AGTTRACCAAT GCTTAATCG TCGGCACT ATCTCAGCA TCTGCTAAT TCGTTCATCC ATAGTGTCT GACTCCCGT CGTGTAGATA
AACCAACTG TCAATGGTTA CGAATTAGT CCGGCACT TCGGCACT ATCTCAGCA TCTGCTAAT TCGTTCATCC ATAGTGTCT GACTCCCGT CGTGTAGATA

4701 ACTCAGTAC GGGAGGCTT ACATCTGGC CCGATGCTG CAATGATCC GCGGACCA CCGTCAACCG CTCGAGATT ATCAGCATA ACCAGCCG
TGATGCTATG CCGTCCGAA TGGTAGCC GGTCAAGAC GTTACTATGG CCGTGTGGT GCGATGACC GAGTCTAAA TAGTGTCTT TTGGTGGCT

4801 CCGAAAGGC CGAGCGAGA AGTGTCTG CAACTTTAT CCGCTCAT CAGTCTATA ATTGTCCG GGAAGCTAGA GTACTAGTT CGCCAGTTAA
GGCTTCCCG GCTCGCTCT TCACCAAGRC GTTGAATAG CCGGAGTAG GTCAATAT TACAAAGCC CTTGCACT CATCATCA GCGGTCAAT

4901 TAGTTGGC AACGTTG CCAATGCTG AGCCATGCTG GTGCAAGT CCGTGTGG TATGCTTCA TTCACTCCG GTTCCCAAAG ATCAAGCGA
ATCAACCGG TTGCAACAAC GGTACAGAG TCCGTAGCAC CACAGTGA GCAGCAACC ATACCAAGT AATCGAGC CAAAGGTTG TAGTCCGCT

5001 GTTACTGAT CCCCCTGTT GTGCAAAA GCGGTTAGT CTTGCTGCT TCGGATGCT GTGCAAGT AATGATGCTA CTCATGTTA CTCATGTTA
CAATGACTA GGGGTACAA CAGTTTTT GCGCAATCGA GGAAGCCAG AGCTAGCA CAGTCTTCA TCAACCGCG TCAACATAGT GATACCAAT

5101 TGGCAGCACT GCATATCTI CTACTGCA TCGCATCGT TCGCATCGT TCGGATGCT GTGCAAGT AATGATGCTA CTCATGTTA CTCATGTTA
ACGTTGTA COTATTAGA GATGACAGT ACGGTAGCA TTCTAGAA AGACTGAC CACTGATG TTGTTGAGT AAGACTCTTA TCACTAGC

5201 GCGACGAGT TGCTTTGCC CCGGTCAAC ACGGATAT ACGGCCAC ATAGCGAAC TTTAAGTG CTCATCTG GAAACGTTT TCGGGCGA
CGCTGGCTCA ACGGACCG GCGGCTTG TGCCCTATA TGGCGGCTG TATGCTTG GATGATGAC CTTTTGCAG AAGCCCCCT

FIG. 3-5
PZH7.chim6.8

5301 A A A C T C T C A A G G A T C T T A C C G C T G T T G A G A T C C A G T T C G A T C C A C C T G T A C C C C A C T C T T C A G C A T C T T T A C T T T C A C C A G C G T T T C T G
 T T T G A G A G T T C C T A G A A T G G C G A C A C T C T A G G T C A A G T C A G C T A C A T T G G G T G A G C A C G T G G T T T G A C T A G A A A T G A A G T G G T C G C A A G A C

5401 G G T G A G C A A A A C H G S A G G C A A A T G C G C C A A A A A G G G A N T M A G S G G G A C A C G S A A A T G T T G A A T A C T C A T C T T T C C T T T T C A A T A T T A T T G A A G
 C C A C T C G T T T T T G T C C T T C G T T T T T C C G T T T T T C C G T T G C C T T T A C A A C T T A T A G A G A A T A C T T A T A G A G A A G T T A T A A C T T C

5501 C A T T A T C A G G T T A T T G C T C A T G A G G G A F A C A T A T T G M A T G T A T T A G M A A A A A A A A A C A A A A A G G G G T T C C G C C C A C A T T C C C C G A A A A G T G C C A
 G T A A A T A G T C C C A A T A A C A G A S T A C T O S C C T A T G T A T A A C T T A C H A A A C T T T T T A T T G T T A T T C C C A A G S G G C G T G T A A G G G G C T T T T C A G G T

5601 C C T G A C G T C A G B A A C C A T T A T A T C A T G A C A T T A C C T A T A A A A A A A A G G G T A T C A G A G G C C C T T T C G T T C A A
 G G A C T G C A G A T T C T T T G G T A A T A A T A G T A C T A T A T T G A T T A T T A T C C C A T A S T G C T C C G G A A G C A G A A G T T

FIG. 4. plásmido pDR1

TTCGAGCTCGCCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA
 TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCT
 GGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCRC
 TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATGACGGT
 AAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG
 TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAAT
 GGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAT
 GGGAGTTTGGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCTGTAACACTCCGCC
 CCATTGACGCAAAATGGGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGT
 TTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGGAGCGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGARGA
 CACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGAAACGGTGCATTGGAAACGGGATTCCCGGT
 GCCAAGAGTACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCGTTA
 GAACGGCTTACAAATTAATACATAACCTTATGTATCATACATACGATTTAGGTGACAC
 TATAGAATAACATCCACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGCCACTCCAGGTCCAACTGC
 ACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGT
 AGCACTGCAACTGGAGTACATTGAGATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTG
 CGCCTCTGGGGCGATAGGGTCAACCTCACCTGCGGTGCCAGTCAGGACATCCGTAATTA
 TTTGACTGGTATCAACAGAAACCGGAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTATACCTC
 CGCCTGGAGTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTGGTCTGGTTCTGGGACGGATTACAC
 TCTGACCATCAGTAGTCTGCAACCGGAGGACTTCGCACTTATTACTGTGACAGGTA
 TACTCTGCGGTGGACGTTCCGACAGGGCACCAAGGTGGAGATCAACGAACTGTGGCTGC
 ACCATCTGCTTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGT
 TGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATTA
 CGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACGCAAGGACAGCAC
 CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACAAGTCTA
 CGCCTGCAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGG
 AGAGTGTAAAGCTTGGCCGCAATGGCCCAACTTGTATTATGACGCTTATAATGGTTACAA
 ATAAAGCAATAGCATCAAAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTG
 TGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGATCGGGAAATTAATCG
 GCGCAGCACCATGGCTGAAATTAACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTTAGGTACCTTCTGAG
 GCGGAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCGGGCTCCC
 CRGCGGCAGAAATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAAGTCAAGCAACAGGTGTGGAAAGT
 CCCAGGCTCCCGCAGGCGAGATGCAAAAGCATGCATCTCAATAGTCAGCAACCA
 TAGTCCCGCCCTAATCCGCCCATCCCGCCCTAATCCCGCCAGTTCGCCCATTCTC
 CGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGACAGAGCCGAGGCCGCTCGGCCCTG
 AGCTATTCCAGAAAGTGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAGCTGT
 TAAACAGCTTGGCACTGGCGGTGTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTTGGCGTTAC
 CCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCCGCACTGGCGTAAATAGCGAAGAGGC
 CCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGTAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGGG
 GTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATACGTCAAAGCAACCATAG
 TACGCGCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGAACC
 GCTACACTTCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTCTCGCC
 ACGTTCGCGGCTTCCCGCTCAAGCTCTAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGGAATT
 ÁGTGCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGAATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG
 CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCCGCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGT
 GACTCTGTTCCAAAGTGAACAACACTCAACCTATCTCGGCTATTCTTTTGAATTA
 TAAGGGATTTTGGCGATTTCCGCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATT
 AACGGAATTTTAAACAAATAATAACGTTTAAATTTATGGTGCACCTCAGTACAAATC
 TGCTGATGCGCATAGTTAAGCCAACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTGATGGCTG
 CGCCCGACACCCGCAACACCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCAT

FIG. 4. cont.

CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCCGT
 CATCACCGAAACGCGCGAGGCAGTATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTAT
 TTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATAATGGTTTCTTAGACGTGAGGTGGCACTTTTCGGG
 GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTATTTCCTAAATACATTCAAAATATGTATCCGC
 TCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTA
 TTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGCCTTTTTCCTTCCGTGTTTTG
 CTCACCCGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
 GTTACATCGAATCGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAC
 GTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGTATGTGGCGGTTATTATCCCGTGATG
 ACGCCGGGCAAGAGCAACFCGGTCCGCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGT
 ACTCACCGTCAAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAAGT
 CTGCCATAACCATGAGTGATAAAGCTGCGGCCAATCTACTTCTGCAACAGATCGGAGGAC
 CGAAGGAGCTAACCCGCTTTTTCACAACTGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTT
 GGGARCCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACCCACGATGCCAGCAG
 CRAATGGCAACAACGTTGCGCAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGGC
 AACAAATAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACAGACCACTTCTGCGCTCGGCC
 TTCGGCTGGCTGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTA
 TCATTGCACTGCGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG
 GGAGTCAGGCAACTATGGATGACGAAATGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGA
 TTAAGCATTGGTAAGTGTGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAC
 TTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAA
 TCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
 CTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAACTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGC
 TACCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGT
 GCTTCAGCAGGCGCGATACCAATACTGCTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACC
 ACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGG
 CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGG
 ATAAGCGCGAGCGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAA
 CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCG
 AAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGA
 GGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGSTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCACCTCT
 GACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGGGAGCCTATGAAAAAACGCCA
 GCAACGCGGCTTTTACGTTCTGCGCTTTTGTGCTGCTTTGCTCACATGTTCTTTC
 CTGCGTTATCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCG
 CTCGCCGACGCCAAGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTACGAGGAAAGCGGAAGAGCGCC
 CAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATCATTAAATCCAGCTGGCACGACA
 GGTTCGCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTAGTTACTCACTC
 ATTAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGA
 GCGGATAACAATTTCCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTA

FIG. 5 - plásmido pDR2

ATTCGAGCTCGCCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
 ATTAGTTACATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC
 TGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGT
 AACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCA
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG
 TAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
 GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTGGCAGTACATCAA
 TGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATGACGTCAA
 TGGGAGTTTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCGTAAACAACTCCGC
 CCATGACGCAAAATGGGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCTATATAAGCAGAGCTCG
 TTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACCTCCATAGAAG
 ACACCGGGACCGATCCAGCTCCGCGCGCGGAAACGCTGTCATTGGAACGCGGATTCCCG
 TGCCAAAGTACGTAAGTACCGCTATAGAGTCTATAGGCCCAACCCCTTGGCTTCGTT
 AGRACGCGGCTACAATTAAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACA
 CTATAGAATATACATCCACTTTCCTTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAACTG
 CACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCCTTTTCTAG
 TAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAAGAAGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCG
 TGCAGCCAGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGTGACGCTTCTGGCTACTCCTTACCAGGCT
 ACATATGAACCTGGGTGCGTCAGGCCCCAGGTAAGGGCCCTGGAATGGGTGACACTGATTA
 ATCCTTATAAAGGTTTACTACCTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCG
 TAGATAAATCCAAAACACAGCCTACCTGCAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTG
 CCGTCTATTTATGTGCTAGAAGCGGATACTACGGCGATAGCGACTGGTATTTTGAAGTCT
 GGGTCAAGGAACCTGGTACCGCTCCTCGGCTCCACCAAGGGCCCATCGGCTTCC
 CCCTGGCACCCCTCCTCCAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
 AGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGCGCCCTGACAGCGGG
 TGCACACCTTCCCGGCTGCTCAAGTCTCAGTACTTACTCCTCAGCAGCGTGGTGA
 CTGTGCCCTTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAAAGCCCA
 GCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAACTTGTGACAAAACCTCAACATGCC
 CACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAC
 CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGGACGTGA
 GCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGTGACGTGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
 CCAAGACAAGCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAAGCTCCTCA
 CCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
 CCTCCCAGCCCATCGAAGAAACCTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAAACAC
 AGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTGACCT
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACG
 CCGAACAACCTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCT
 ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
 TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
 AATGAGTGGACGGCCCTAGAGTGCACCTGCAGAAGCTTGGCCGCTGAGCCCAACTTGT
 TTATTGCAAGCTTATAATGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCAAAATTTCAAAATAAG
 CATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATG
 TCTGGATCGATCGGGAATTAATTCGGCGCAGCACCATGGCCTGAAATAACCTCTGAAGA
 GGAACCTTGGTTAGTACTTCTGAGGGCGAAAGAACCATCTGTGGAATGTGTGTCAGTTA
 GGGTGTGGAAGTCCCAGGCTCCCGCAGGCGAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT
 TAGTCAGCAACAGGTGTGGAAGTCCCAGGCTCCCGCAGGCGAGAAGTATGCAAAAGC
 ATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCTAGTCCCGCCCTAATCTCCGCCCATCCCGCCCTA
 ACTCCGCCAGTTCGGCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCA
 GAGGCCGAGGCGCCCTCGGCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGGAGGAGGCTTTTTTGG
 GGCTAGGCTTTTGAAGAAAGCTGTTAACAGCTTGGCACTGGCGTCTTTTACAACGTC
 GTGACTGGAAAACCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCG

FIG. 5 cont.

CCAGTTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGTAGCC
 TGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTAC
 ACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGGGCGCATTAAAGCGCGCGGG
 TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCGTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCCTT
 CGCTTCTTCCCTTCTTTCGCGCACGTTGCGCGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCG
 GGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGA
 TTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATGACGCGTTTTTCGCCCTTTGAC
 GTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAAACAACACTCAACCC
 TATCTCGGGCTATCTTTGATTTATAAGGGATTTTCCGATTTCCGGCTATTGGTTAAA
 AAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGCAATTTTAAACAAATATTAACGTTTACAA
 TTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAACTCCGCTA
 TCGCTACGTGACGCGGTCACTGGCTGCGCCCGACCCGACACCCGCTGACGCGCC
 TGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACGACAAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAG
 TGCATGTGTACAGAGTTTTCACCGTCTACCGAAACGCGCGAGGCAATTTCTGAGA
 CGAAGGGCCTCGTATACGCCATTTTATAGGTTAATGTATGATAAATAGTGTCT
 TAGACGTCAGTGGCACTTTTCCGGGAAATGTGCGCGAAACCCCTATTGTGTTATTTTC
 TAAATCATTCAAAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATA
 TATTGAAAAGGAAAGATATGATTTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTCCCTTTTT
 GCGGCTTTTCCCTTCTGTTTTCGCTCACCCAGAAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCT
 GAAGATCAGTTGGGTGACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATC
 CTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAACGTTTCCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTA
 TGTGGCGCGGTATTTACCGGTGATGACGCGCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATAC
 TATCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCACTCAGAAAAGCATCTTACGGATGGC
 ATGACAGTAAAGAAATTTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGAATAACACTGCGGCCAAC
 TTACTCTGACAAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCGCTTTTTGACAAACATGGGG
 GATCAGTAACTCGCCCTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGAC
 GAGCGTGACACCAGATGCCAGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACGGC
 GAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGAATGGAGGGGATAAAGT
 GCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGA
 GCCGCTGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTGACGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
 CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG
 ATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTACTCA
 TATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATC
 CTTTGTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGTGGATTTTCCGTTCACTGAGCGTCA
 GACCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGC
 TGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCGCGGTGGTTTGTGCGCGGATCAAGAGCTA
 CCAACTCTTTTCCGAAGTAACTGGCTTACGACAGCGCAGATACCAAACTACTGTCCTT
 CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC
 GCTCTGTAATCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTGTGCTTACCGGG
 TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGTTCCG
 TGCAACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAACCTGAGATACCTACAGCGTGA
 CATTGAAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGTTAAGCGGC
 AGGGTCGAAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTAT
 AGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAAGCTGATTTTGTGATGCTGCTCAGG
 GGGCGGACCTATGGA AAAACGCGACCAACCGCGCTTTTACGGTTCCTGGCTTTTCG
 TGGCTTTTGTCTCAGTGTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATT
 ACCGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGACCGGACGACCGGCGCAGCGAGTCA
 GTGACGAGGAAAGCGAAGAGCGCCRAATACGCAAAACCGCTTCCCGCGCGTGGCCG
 ATTCATTAATCCAACCTGGCACGACAGTTTCCGACTGAAAAGCGGGCAGTGAAGCGAAC
 GCAATTAATGTGAGTTACTCACTATTAGGACCCCGAGCTTACACTTTATGCTTCCG
 GCTCGTATGTTGTGGAAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGAC
 CATGATTACGAATTA

FIG. 6

hu2H7.v16cadena L[232 aa]

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHYQQKPGK
APKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQWTFNPPFTFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 7

hu2H7.v16 cadena H [471 aa]

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGYTFTSYNMHWVRQAP
GKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRPTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVY
YNSYWFYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFGCSVMHEALHNHYTQKLSLSFGK

FIG. 8

hu2H7.v31_cadena H[471 aa]

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAP
GKGLEWVGAIYPGNQDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVVY
YSNSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKQPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTY
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKVE
PKSCDKTHSTCPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKPN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 9

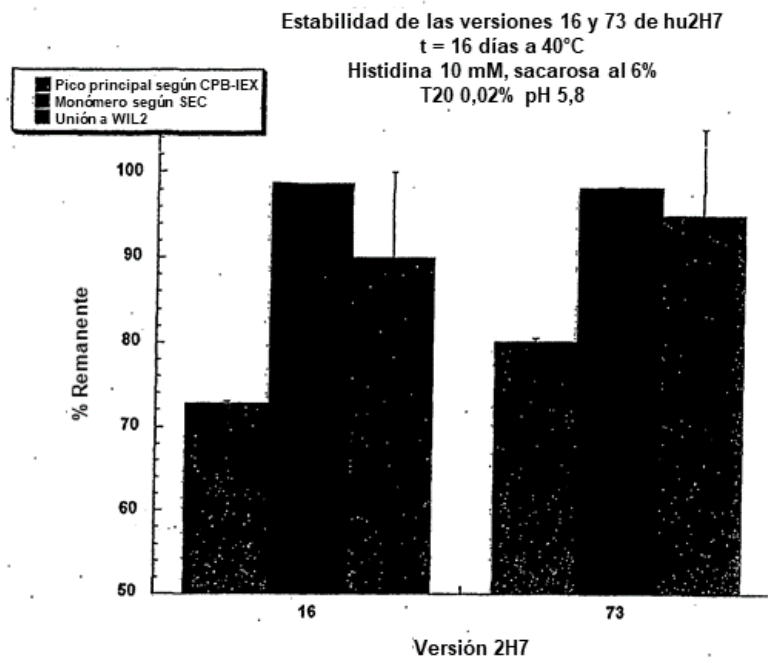


FIG. 10

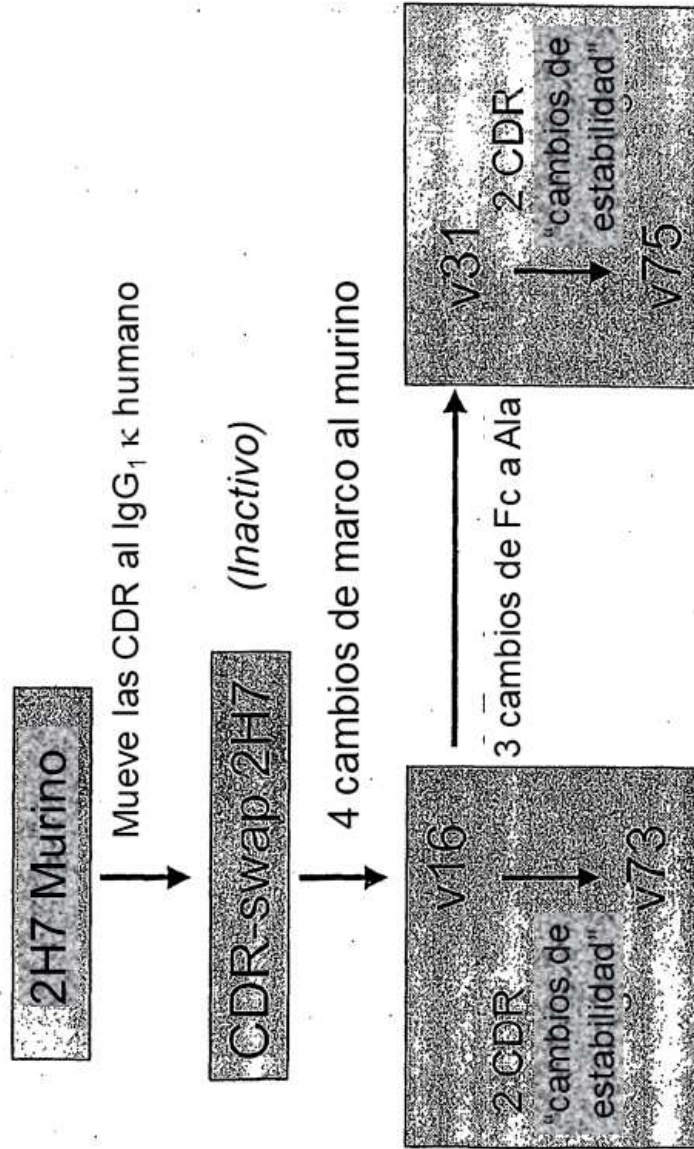


FIG. 11

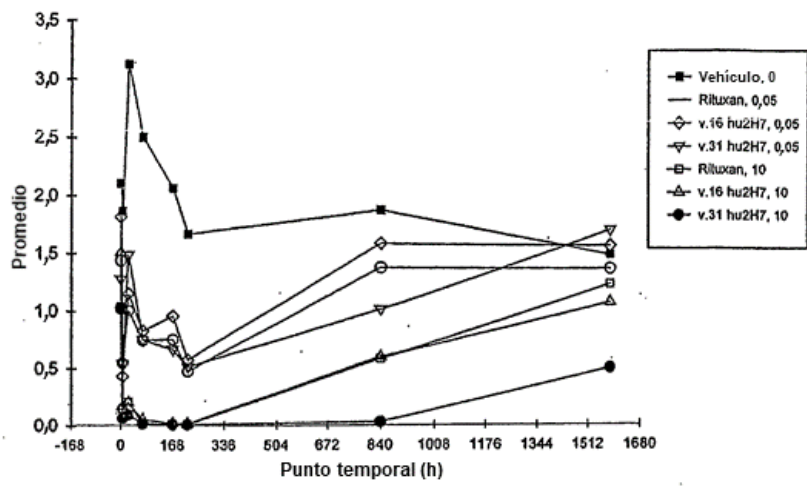


FIG. 12

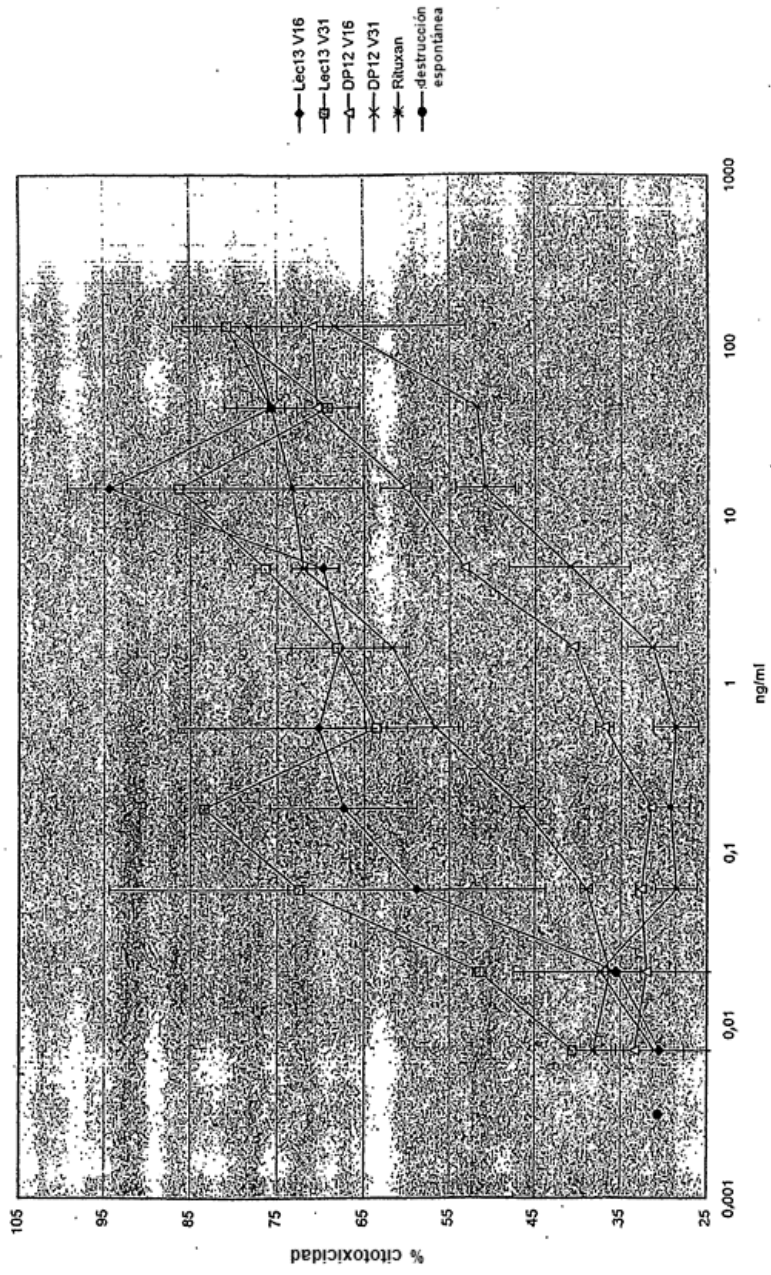


FIG. 13
Actividad apoptótica: tinción con Anexina V

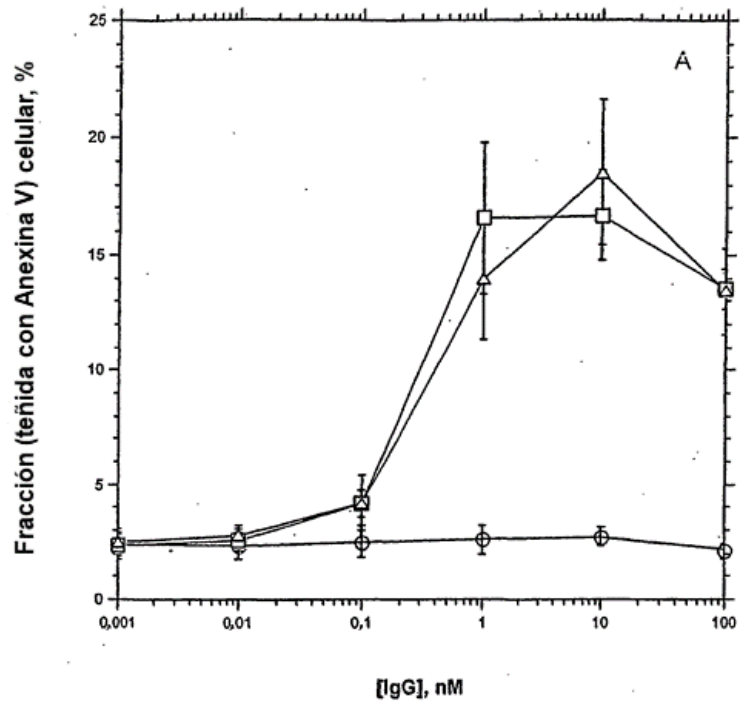


FIG. 14

Actividad apoptótica: tinción doble con Anexina V y yoduro de propidio

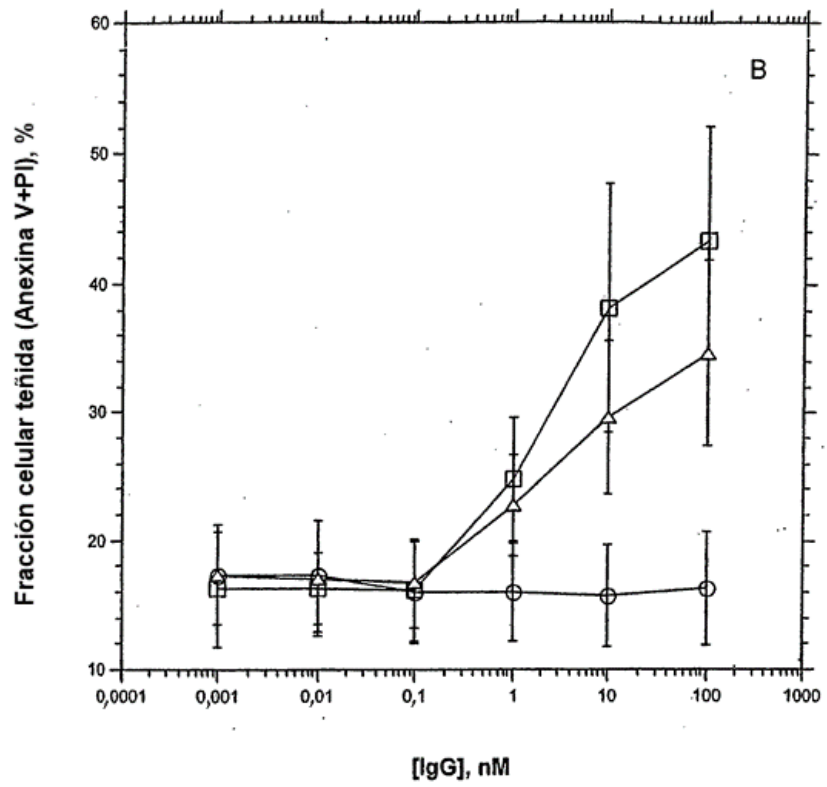


FIG. 15

Actividad apoptótica: células vivas no teñidas

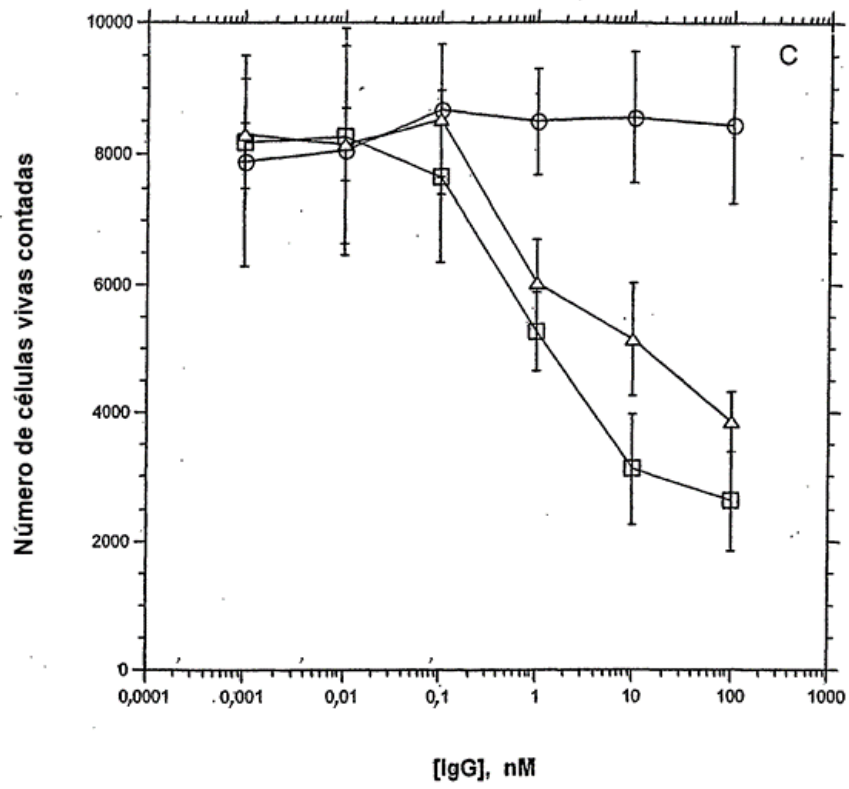


FIG. 16

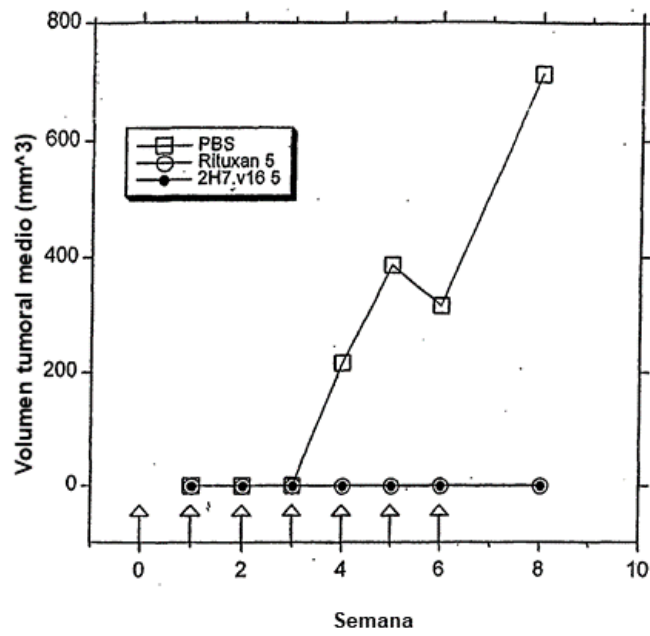


FIG. 17

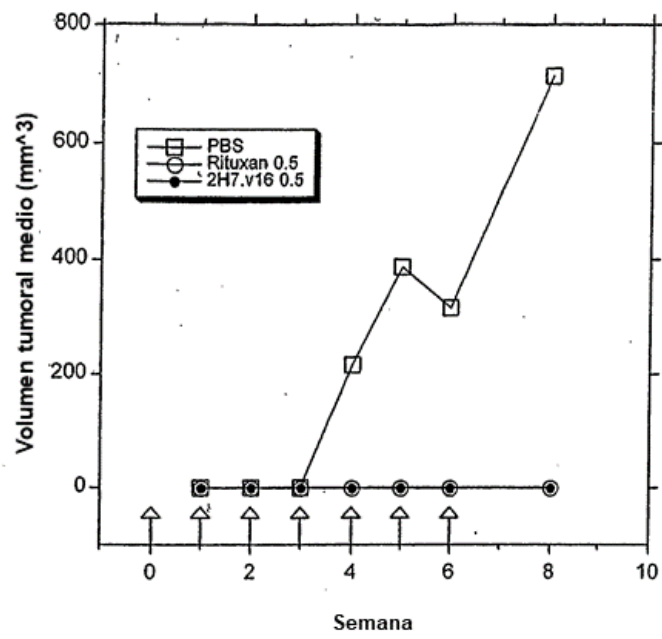


FIG. 18

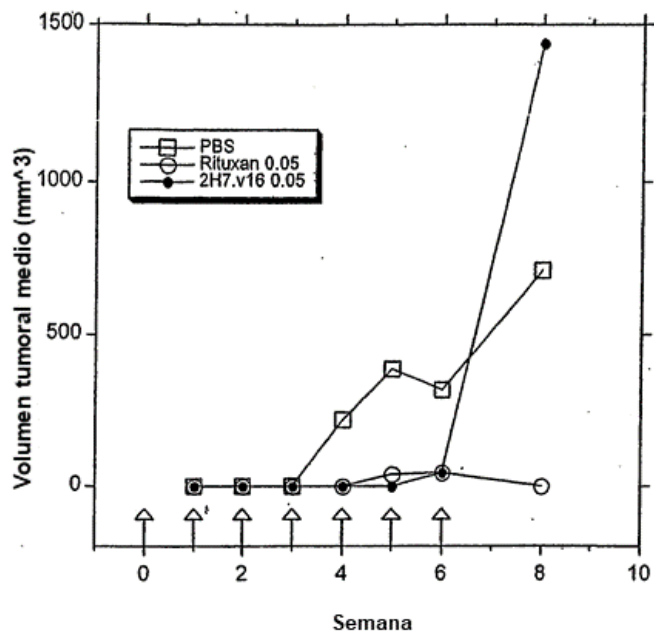


FIG. 19

```

1  ATGACAAACAC CCGAAATTC AGTAAATGGG ACITTCOCAG
METThrThrPro ArgAsnSer ValAsnGly ThrPheProA
41  CAGAGCCAAT GAAAGGCCCT ATTGCTATGC AACCTGGTCC
laGluProMET LysGlyPro IleAlaMETGln ProGlyPr
81  AAAACCACTC CTCAGGAGGA TGCTTCACT GGTGGGTCCC
oLysProLeu LeuArgArgMET SerSerLeu ValGlyPro
121  ACGCAAAGCT TCTTCATGAG GGAATCTAAG GCTTGGGGG
ThrGlnSerPhe PheMETArg GluSerLys AlaLeuGlyA
161  CTGTCCAGAT TATGAATGGG CTCTCCACA TTGCCCTGGG
laValGlnIle METAsnGly LeuPheHisIle AlaLeuGl
201  GGGTCTCTCG ATGATCCAG CAGGGATCTA TGCACCCATC
yGlyLeuLeu METIleProAla GlyIleTyr AlaProIle
241  TGTGTACTG TGTGGTACCC TCTGTGGGA GGCATTATGT
CysValThrVal TrpTyrPro LeuTrpGly GlyIleMETT
281  ATATTATTTC CGGATCACTC CTGGCAGCA CGGAGAAAAA
yrIleIleSer GlySerLeu LeuAlaAlaThr GluLysAs
321  CTCAGGAAG TGTTGGTCA AAGGAAAAAT GATAATGAAT
nSerArgLys CysLeuValLys GlyLysNET IleMETAsn
361  TCATTGAGCC TCTTGTGTC CATTCTGGA ATGATTCTTT
SerLeuSerLeu PheAlaAla IleSerGly METIleLeuS
401  CAATCATGGA CATACTTAAT ATAAAAATTT CCCATTTTTT
erIleMETAsp IleLeuAsn IleLysIleSer HisPheLe
441  AAAAAATGAG AGTCTGAATT TTATCAGAGT TCACACACCA
uLysMETGlu SerLeuAsnPhe IleArgVal HisThrPro
481  TATATTAACA TATACAACCTG TGAACCACT AATCCCTCTG
TyrIleAsnIle TyrAsnCys GluProAla AsnProSerG
521  AGAAAACTC TCCATCTACT CAATACTGTT ACAGCATAA
luLysAsnSer ProSerThr GlnTyrCysTyr SerIleGl
561  ATCTCTGTTT CTTGGCATTT TGTCACTGAT GGTGATCTTT
nSerLeuPhe LeuGlyIleLeu SerValMET LeuIlePhe
601  GCCTCTTCC AGGAAGTGT AATAGCTGGC ATCGTTGAGA
AlaPhePheGln GluLeuVal IleAlaGly IleValGluA
641  ATGAATGGAG AAGAACATGC TCCAGACCA AATCTAGCGT
snGluTrpArg ArgThrCys SerArgProLys SerSerVa
681  AGTCTCCTG TCAGCTGAG AAAAAAAGA ACAAGTCAAT
IValLeuLeu SerAlaGluGlu LysLysGlu GlnValIle
721  GAAATAAAG AAGAAGTGT TGGCTTACT GAAACATCTT
GluIleLysGlu GluValVal GlyLeuThr GluThrSerS
761  CCCAACCAA GAATGAAGAA GCCATGAAA TTATTCCAAT
erGlnProLys AsnGluGlu AlaIleGluIle IleProIl
801  CCAAGAAGAG GAAGAAGAG AACACAGAC AACTTTCCA
eGlnGluGlu GluGluGluGlu ThrGluThr AsnPhePro
841  GAACCTCCC AAGATCAGGA ATCTCACCA ATAGAAAATG
GluProProGln AspGlnGlu SerSerPro IleGluAsnA
881  ACAGCTCTCC T
spSerSerPro

```


FIG. 21

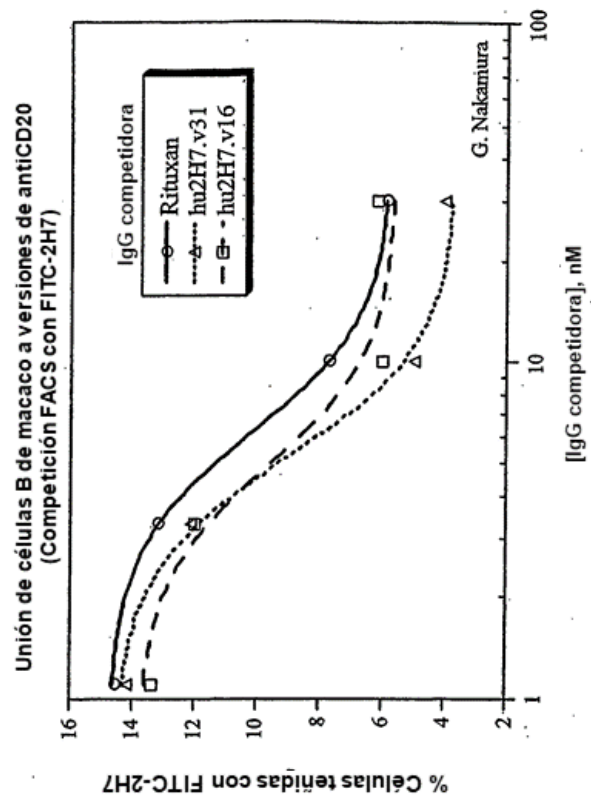


Fig. 22

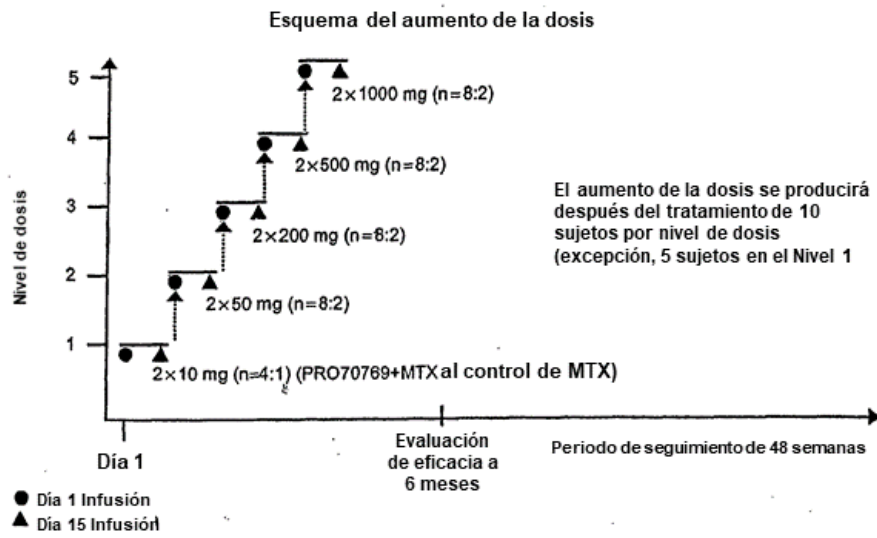


FIG. 23

SV40.PD.hu2H7.H16.SV.L16
8.277 kb

