

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 570**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2011 PCT/IB2011/050646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11101791**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2011 E 11707918 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2536764**

54 Título: **Anticuerpos humanizados anti-CD28**

30 Prioridad:

13.07.2010 EP 10290389
18.02.2010 EP 10290080

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.09.2018

73 Titular/es:

OSE IMMUNOTHERAPEUTICS (50.0%)
22 Boulevard Benoni Goullin
44200 Nantes, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (50.0%)

72 Inventor/es:

MARY, CAROLINE;
POIRIER, NICOLAS y
VANHOVE, BERNARD

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 680 570 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

Anticuerpos humanizados anti-CD28

5 La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados que se enlazan con CD28, y fragmentos monovalentes de los mismos, y sus usos terapéuticos, en particular en el contexto de regulación de activación de célula T.

10 La activación anormal de células T está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes, y también en el fenómeno de rechazo de trasplante, donde provocan una respuesta inmune dirigida contra el órgano trasplantado que se desarrollará.

15 Una de los sistemas más importantes para regular la activación de linfocito T es el sistema molecular B7/CD28/CTLA4. Este sistema juega, por ejemplo, un papel esencial en los mecanismos de rechazo de trasplante (WOODWARD et al., *Transplante*, 55, 14-20, 1998). Las moléculas B7.1 (CDE80) y B7.2 (CD86) cargadas por APCs pueden activar el receptor CD28 y también el receptor CTLA4 de linfocitos T. La activación de CD28 envía al linfocito T una señal positiva que estimula a la célula; por otro lado, la activación de CTLA4 envía una señal negativa que lleva a una no respuesta (anergia) (FALLARINO et al., *J. Exp. Med.*, 188, 205-210, 1998).

20 Los linfocitos T en reposo expresan una gran cantidad de CD28 y muy poco CTLA4. Cuando hay un primer contacto cognitivo entre un APC y un linfocito T, la interacción CD28/B7 se favorece, lo que activa la célula. Es solamente varias horas después del inicio de la activación que, debido al aumento en la expresión de membrana de CTLA4, cuya afinidad para B7 es de 5 a 10 veces mayor que la de CD28, la interacción B7/CD28 se desplaza en favor de una interacción B7/CTLA4.

25 Los linfocitos T reguladores expresan una gran cantidad de CD28 y de CTLA4 que previenen o permiten, respectivamente, la actividad supresora de linfocitos T reguladores. En presencia de un APC que expresa un alto nivel de B7, la interacción CD28/B7 previene la actividad supresora de linfocitos T reguladores (Sansom, et al., *Immunol.* 24, 314-319, 2003).

30 La inhibición selectiva de la señal agonista dada para la célula T por CD28, que deja el sistema antagonista consistente en el par CTLA4/B7 intacto, por medio de bloqueo específico de la interacción CD28/B7, hará posible prevenir la activación de linfocito T y promover la supresión inmune mediante linfocitos T reguladores. Tal bloqueo específico de la interacción CD28/B7 puede obtenerse usando algunos anticuerpos dirigidos contra CD28.

35 Estos anticuerpos se usarán en una forma monovalente (por ejemplo, como fragmentos Fab o scFV), ya que cuando se usan en su forma nativa divalente, su enlace con CD28 provoca la dimerización y la activación de su receptor. Los fragmentos Fab contienen, cada uno, una cadena ligera y la primera mitad de una cadena pesada; los fragmentos scFv consisten en porciones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo matriz, conectadas entre sí por medio de un conector variables (CLACKSON, et al., *Nature*, 352, 624-628, 1991), formando así una proteína de cadena única. Un anticuerpo así es el anticuerpo CD28.3, producido por la línea celular de hibridoma CNCM I-2582, y desvelado en la solicitud PCT WO 02/051871. Este anticuerpo, cuando se usa en forma monovalente como los fragmentos scFV, es capaz de bloquear in vitro al receptor CD28 sin activarlo (PCT WO 02/051871; VANHOVE et al., *Blood*, 102, 564-70, 2003), y también ha demostrado su eficacia in vivo en modelos de trasplante de órganos en ratones y en primates (POIRIER et al., *Congreso Mundial de Trasplantes*, Sidney, Australia, Agosto 16-21, 2008; POIRIER et al., *Sci Trans Med.*, 2:17, p17ra10, 2010).

40 Un inconveniente de todos los anticuerpos monoclonales derivados de fuentes murinas es su inmunogenicidad cuando se administran a sujetos humanos. Provocan una respuesta inmune anti-ratón que da como resultado una menor eficacia del tratamiento, en particular cuando se requiere una administración repetida.

45 Este inconveniente puede evitarse, en principio, mediante el uso de anticuerpos humanizados. El objetivo de la humanización es obtener un anticuerpo recombinante que tenga propiedades de enlace con antígeno similares a las del anticuerpo monoclonal de ratón del cual se derivaron las regiones determinantes de complementariedad (RDC), y que es mucho menos inmunogénico en humanos.

50 Las RDC son las porciones de los dominios variables de un anticuerpo que contactan directamente con el antígeno y determinan la especificidad de enlace con antígeno; las regiones del armazón (RA) que están situadas entre RDC en los dominios variables no contactan directamente con el antígeno, pero sirven como un andamio para mantener la estructura global de los dominios variables.

55 Se han presentado varias técnicas para humanización de anticuerpos. Las más usadas se basan en "injerto RDC", que implica el trasplante de las RDC de un anticuerpo murino a RA humanas apropiadas. Sin embargo, en muchos anticuerpos, algunos residuos de RA son importantes para el enlace de antígeno, porque influyen en la conformación de RDC y por lo tanto en sus propiedades de enlace con antígeno, en particular la afinidad de enlace.

Una pérdida en la afinidad de enlace es particularmente negativa en el caso de que se pretenda usar el anticuerpo en una forma monovalente que generalmente muestra menos afinidad para el antígeno que el anticuerpo divalente nativo. Así, en la mayoría de los casos, es además necesario, con el fin de obtener una suficiente afinidad de enlace, reintroducir uno o más residuos de armazón del anticuerpo humano en las RA humanas, con el riesgo de que vuelva a aparecer de manera simultánea inmunogenicidad no deseada.

Otra técnica para humanización de anticuerpos, llamada "desinmunización" implica la identificación dentro de las regiones RA del anticuerpo, de célula B y epítopes de célula T reconocidos como "extraños" y por lo tanto potencialmente inmunogénicos en humanos, y retirarlos mediante sustituciones apropiadas de aminoácidos. Esta técnica, sin embargo, también conlleva el riesgo de que se eliminen residuos de MA importantes para el enlace de antígeno. Además, algunos epítopes inmunogénicos pueden estar situados en las RDC e intentar retirarlos implica un riesgo muy alto de destruir no solamente la afinidad de enlace con antígeno sino también la especificidad de enlace con antígeno del anticuerpo.

Por lo tanto, una principal preocupación en la humanización de anticuerpos es determinar qué residuos de aminoácidos son cruciales para retener las propiedades de enlace con antígeno. Se han propuesto varios métodos para predecir los sitios más apropiados para sustitución en las regiones RA. Aunque proporcionan principios generales que pueden ser de alguna ayuda en las primeras etapas de humanización, el resultado final varía en gran medida de un anticuerpo a otro. Así, para un anticuerpo dado, es muy difícil predecir qué sustituciones proporcionarán el resultado deseado. En el caso donde no sólo hay sustituciones en RA, sino también en RDC, será necesario disminuir satisfactoriamente la inmunogenicidad en humanos, el resultado final se vuelve totalmente impredecible.

Tan et al., Blood 96:11, 31ª, 2000 desvela un método para producir un anticuerpo funcional anti-CD28 humanizado;

Saldanha: "Capítulo 6: Ingeniería molecular I: Humanización" en: Stephan Duebel: "Manual de Anticuerpos Terapéuticos", Wiley-VCH, 119-144, 2007 desvela métodos de humanización de anticuerpos.

WO 2010/009391 desvela anticuerpos de dominio que consisten en o comprenden un único dominio variable de inmunoglobulina que se enlaza específicamente y antagoniza la actividad de CD28.

WO 2010/082136 desvela anticuerpos monovalentes recombinantes que son heterodímeros de una primera cadena de proteínas que comprende un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de interés y los dominios CH1 y CH3 de una inmunoglobulina IgG y una segunda cadena de proteínas que comprende el dominio variable de la cadena ligera de dicha inmunoglobulina de interés y los dominios CH2 y CH3 de dicha inmunoglobulina IgG.

WO 2010/070047 desvela polipéptidos solubles de enlace con CD47, para su uso como un medicamento, en particular para la prevención o tratamiento de trastornos autoinmunes e inflamatorios.

Los inventores han tenido éxito en la producción de CD28.3 humanizado (a partir de ahora referidos como hCD28.3), con una baja inmunogenicidad, y que, aunque tiene varias sustituciones de aminoácidos que incluyen la sustitución no conservadora K→Q en CDR2 de la cadena pesada, conserva las propiedades de enlace con CD28 del ratón matriz CD28.3. Cuando se usa en una forma monovalente, el hCD28.3 de la invención también retiene las propiedades de enlace con CD28 del ratón matriz CD28.3.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD28 que tiene un sitio de enlace con CD28 consistente en:

- un primer dominio variable (también aquí definido como "dominio variable de cadena pesada") definido por la siguiente secuencia:

VQLQQSGAELKKPGASVKVSCASGYTFTEYIIHWIKLRSGQGLEWI
 GWFYPGSNDIQYNAQFKGKATLTADKSSSTVYMELTGLTPEDSAVYFCARRDDFSG
 YDALPYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 1),

donde dicho dominio variable puede además comprender opcionalmente un residuo Q en su extremo de terminal N;

- un segundo dominio variable (también aquí definido como "dominio variable de cadena ligera") definido por la siguiente secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKTNENIYSNLAWYQQKDGKSPQLL
 IYAATHLVEGVPSRFSGSGSGTQYSLTISSLQPEDFGNYQCQHFVWGTPTFGGGTKLEI

KR, donde X = C o A.

5 Aquí también se desvela un anticuerpo que tiene un sitio de enlace con CD28 consistente en:

- un primer dominio variable que tiene las RDC del dominio variable de la SEQ ID NO: 1;
- un segundo dominio variables que tiene las RDC del dominio variable de la SEQ ID NO: 2.

10 El término "anticuerpo anti-CD28" aquí se refiere a cualquier proteína de enlace con antígeno que tiene al menos un sitio de enlace con antígeno (consistente en los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada) capaces de enlazarse específicamente con CD28. Abarca anticuerpos en una forma divalente (como moléculas nativas de inmunoglobulina o fragmentos F(ab)'2) con dos sitios de enlace con CD28, así como anticuerpos en una forma monovalente que tienen un único sitio de enlace con CD28 (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', Fv y scFv). En la mayoría de los casos, se preferirán los anticuerpos en una forma monovalente.

15 Incluye anticuerpos recombinantes particulares que comprenden un sitio de enlace con CD28 asociado con uno o más polipéptidos heterólogos.

20 A modo de ejemplo, un anticuerpo de la presente divulgación puede ser un fragmento Fab o Fab' recombinantes que contiene el dominio constante CH1 de una inmunoglobulina humana fusionado en el extremo de la terminal C del domino variable de la SEQ ID NO: 1, y el dominio constante CL de una inmunoglobulina humana fusionado en el extremo de la terminal C del dominio variable de la SEQ ID NO: 2. Un ejemplo de tal fragmento Fab recombinante es un fragmento Fab con una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos 21-251 de la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos 21-234 e la SEQ ID NO: 6.

25 También, un anticuerpo hCD28.3 puede comprender, además de los dominios variables de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, definidas anteriormente, uno o más de los siguientes componentes:

30 -una región constante humana (Fc). Esta región constante puede seleccionarse entre dominios constantes de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y un isotipo, que incluyen, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las regiones constantes preferentes se seleccionan entre dominios constantes de IgG, en particular IgG4.

35 - una proteína que hace posible prolongar la vida media del plasma cuando se administra in vivo bajo formas monovalentes como se desvela, por ejemplo, en PCT WO 02/051871; en una realización preferente, dicha proteína es los dominios CH2-CH3 de una molécula IgG, como se desvela en PCT/IB/2010/000196; de acuerdo con esta realización, un anticuerpo monovalente hCD28.3 es un heterodímero de:

- una primera cadena de proteínas consistente esencialmente, desde su terminal N a su terminal C, en:
 - *una región A que tienen la SEQ ID NO: 1;
 - *una región B consistente en un conector peptídico y los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina IgG;
- 40 - una segunda cadena de proteínas consistente, esencialmente, desde su terminal N a su terminal C, en:
 - *una región A' que tienen la SEQ ID NO: 2;
 - *una región B idéntica a la región B del primer polipéptido.

45 Preferentemente, el conector peptídico es la región bisagra de inmunoglobulina IgG1 humana que tiene la secuencia EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 7), y los dominios CH2 y CH3 son aquellos de una inmunoglobulina de la subclase IgG4. También se puede usar una versión acortada de dicha región bisagra, que tiene la secuencia DKTHTCPPCP (SEQ ID No: 8):

50 De acuerdo con una realización preferente, la secuencia de polipéptido de la primera cadena de proteínas es la secuencia de aminoácidos 21-368 de SEQ ID NO: 10, y la secuencia de polipéptido de la segunda cadena de proteínas es la secuencia de aminoácidos 21-355 de SEQ ID NO: 12. De acuerdo con otra realización preferente, la secuencia de polipéptido de la primera cadena de proteínas es la secuencia de aminoácidos 21-373 de SEQ ID NO: 14, y la secuencia de polipéptido de la segunda cadena de proteínas es la secuencia de aminoácidos 21-360 de SEQ ID NO: 16.

55 Opcionalmente, un anticuerpo h CD28.3 de la invención puede además comprender uno o más de los siguientes componentes

- 60 - una proteína que tiene actividad farmacológica (por ejemplo, una toxina);
- uno o más polipéptidos de etiqueta.

65 Alternativamente, para prolongar la vida media del plasma, en particular cuando están bajo la forma de fragmentos Fab, los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con polímeros solubles en agua como glicol de polietileno (PEGilación). La pegilación es una manera clásica para mejorar las propiedades farmacocinéticas de polipéptidos terapéuticos, y puede conseguirse mediante técnicas conocidas.

En este aspecto, los inventores descubrieron que la sustitución del residuo de cisteína original en la posición 96 del dominio variables del CD 28.3 nativo por un residuo de alanina o asparraguina (dando como resultado un anticuerpo que tiene una cadena ligera que contiene un dominio variables de SEQ ID NO: 2 donde X = A o N) permitió una mejor eficacia en la pegilación del anticuerpo usando glicol de polietileno activado con maleimida (residuo de cisteína reactiva objetivo), sin modificar sustancialmente su actividad de enlace, aunque la cisteína-96 está comprendido en el CDR3 de la cadena ligera del anticuerpos. El beneficio de la sustitución del residuo original de cisteína en la posición 96 del dominio variables consiste en una ramificación específica del glicol de polietileno en el residuo de cisteína C-terminal de la cadena pesada. Sin sustitución del residuo de cisteína original en la posición 96 del dominio variables del CD28.3 nativo, el glicol de polietileno activado con maleimida puede enlazarse con el residuo de cisteína y alterar la actividad de enlace de la molécula Faba. Los inventores también descubrieron que la adición de una extensión de di-alanina después de la cisteína en terminal C de la cadena pesada también dio como resultado una mejor eficacia de pegilación.

La invención proporciona un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención.

También se desvela un polinucleótido seleccionado entre:

- a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene las RDC de SEQ ID NO: 1, en particular un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene las RDC de SEQ ID NO: 2, en particular un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2;
- c) un polinucleótido que codifica un anticuerpo hCD28.3 de la invención, como se ha definido anteriormente.

Los polinucleótidos de la invención también comprenden generalmente secuencias adicionales: por ejemplo, pueden comprender ventajosamente una secuencia que codifica una secuencia líder o péptido señal que permite la secreción de dicha cadena de proteínas.

La presente divulgación también abarca vectores recombinantes, en particular vectores de expresión, que comprenden un polinucleótido de la invención, asociados con elementos que controlan la transcripción y traslación que están activos en la célula huésped elegida. Los vectores que pueden usarse para construir vectores de expresión de acuerdo con la divulgación son conocidos por sí mismos, y se elegirán en particular como una función de la célula huésped que se pretenda usar.

La presente divulgación también abarca células huéspedes transformadas con un polinucleótido de la invención. Preferentemente, dicha células huésped se transforma con un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora de la cadena pesada de un anticuerpo hCD28.3 de la invención y un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora de la cadena ligera de un anticuerpo hCD28.3 de la invención, y expresa dicho anticuerpo. Dichos polinucleótidos pueden insertarse en el mismo vector de expresión, o en dos vectores separados de expresión.

Las células huéspedes que pueden usarse en el contexto de la presente invención pueden ser células procarióticas o eucarióticas. Entre las células eucarióticas que pueden usarse, se hará mención particular a las células de plantas, células de levadura, como *Saccharomyces*, células de insectos, como células de *Drosophila* o *Spodoptera*, y células de mamífero como células HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc.

La construcción de vectores de expresión de la divulgación y la transformación de las células huéspedes puede realizarse mediante técnicas convencionales de biología molecular.

Otro objeto de la divulgación es un método para preparar un anticuerpo hCD28.3 de la invención. Dicho método comprende cultivar una célula huésped transformada con un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora de la cadena pesada de un anticuerpo hCD28.3 de la invención y un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora de la cadena ligera de un anticuerpo hCD28.3 de la invención y recuperar dicho anticuerpo de dicho cultivo.

Si el anticuerpo se secreta por la célula huésped, puede recuperarse directamente del medio de cultivo; si no es así, se realizar una lisis celular de antemano. El anticuerpo puede después purificarse el medio de cultivo o del lisado celular mediante procedimientos convencionales conocidos por sí mismos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, precipitación fraccionada, en precipitación particular con sulfato de amoníaco, electroforesis, filtración con gel, cromatografía por afinidad, etc.

Los anticuerpos hCD28.3 de la invención pueden usarse para obtener productos medicinales. Estos productos medicinales también son parte del objeto de la invención.

La presente invención también comprende una composición terapéutica que comprende un anticuerpo hCD28.3 de la invención, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente, dicha composición es una composición para administración parenteral, formulada para permitir la administración de una dosis de desde 0,5 a 20 mg/Kg, ventajosamente de desde 5 a 10 mg/Kg de un anticuerpo hCD28.3 de la invención. La ruta de inyección de la composición puede ser preferentemente subcutánea o intravenosa.

Por ejemplo, anticuerpos hCD28.3 de la invención pueden usarse para obtener productos medicinales inmunosupresores que selectivamente bloquean el fenómeno de activación de célula T que implica el receptor CD28. Tales productos medicinales inmunosupresores que actúan mediante bloqueo selectivo de CD28 tienen aplicaciones en todas las condiciones patológicas dependientes de linfocito T, incluyendo en particular rechazo de trasplante, enfermedad injerto contra huésped, enfermedades autoinmunes mediadas por linfocito T, como diabetes de tipo I, artritis reumatoide o esclerosis múltiples, e hipersensibilidad de tipo IV, que está incluida en fenómenos alérgicos y también en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas, en particular después de una infección con un agente patogénico (en particular, lepra, tuberculosis, leishmaniasis, listeriosis, etc.).

La presente invención se entenderá de manera más clara a partir de la siguiente descripción a continuación, que se refiere a ejemplos no limitativos de la preparación y propiedades de un anticuerpo hCD28.3 de acuerdo con la invención.

La construcción de vectores de expresión de la divulgación y la transformación de células huéspedes puede hacerse mediante técnicas estándares de biología molecular.

Un anticuerpo hCD28.3 de la invención puede obtenerse cultivando una célula huésped que contiene un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo, bajo condiciones adecuadas para la expresión de los mismos, y recuperar dicho anticuerpo del cultivo de células huéspedes.

La presente invención se ilustrará además por la siguiente descripción adicional, que se refiere a ejemplos que ilustran las propiedades de anticuerpos hCD28.3 de la invención. Debería entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se dan únicamente a modo de ilustración de la invención y no constituyen de ninguna manera una limitación de los mismos.

Leyendas de los dibujos

Figura 1: secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la construcción Señal-VH-hCH1. Negrita: secuencia líder; Subrayado: posiciones de RDC de anticuerpo CD28.3 matriz. Cursiva: región CHI humana; Marcado y con doble subrayado: sustituciones hechas en la región VH de anticuerpo CD28.3.

Figura 2: secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la construcción Señal-VL-hCK. Negrita: secuencia líder; Subrayado: posiciones de RDC de anticuerpo CD28.3 matriz. Cursiva: región kappa c humana; Marcado y con doble subrayado: sustituciones hechas en la región VL de anticuerpo CD28.

Figura 3: A) densidad óptica a 405 nm para mayores concentraciones de FR104, hCD28.3 Fab o CD28.3 Fab en el Enlace ELISA; B) cálculo de las curvas de regresión, lo que permite la determinación de valores comparativos AC50.

Figura 4: secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la construcción hVHCD28.3-bisagra corta γ 1-hy4CH2CH3. Negrita: secuencia líder; Subrayado: RDC. Doble subrayado: región bisagra. Subrayado con puntos: dominios CH2-CH3 de IgG4 humano.

Figura 5: secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la construcción hVLCD28.3-bisagra corta γ 1-hy4CH2CH3. Negrita: secuencia líder; Subrayado: RDC. Doble subrayado: región bisagra. Subrayado con puntos: dominios CH2-CH3 de IgG4 humano.

Figura 6: secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la construcción hVHCD28.3-bisagra completa γ 1-hy4CH2CH3. Negrita: secuencia líder; Subrayado: RDC. Doble subrayado: región bisagra. Subrayado con puntos: dominios CH2-CH3 de IgG1 humano.

Figura 7: secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la construcción hVLCD28.3-bisagra completa γ 1-hy4CH2CH3. Negrita: secuencia líder; Subrayado: RDC. Doble subrayado: región bisagra. Subrayado con puntos: dominios CH2-CH3 de IgG1 humano.

Figura 8: propiedades de enlace Anti-CD28 de anticuerpos monovalentes hVH/VL CD28.3. Células COS se con-transfectaron con 2 μ g (cada una) de pSeñal-hVH- bisagra corta γ 1-hy4CH2CH3 y pSeñal-hVL- bisagra corta γ 1-hy4CH2CH3, o co-transfectadas con 2 μ g (cada una) de pSeñal-hVH- bisagra completa γ 1-hy4CH2CH3 y pSeñal-hVL- bisagra completa γ 1-hy4CH2CH3. Después de 6 días, los sobrenadantes se recogieron y los anticuerpos monovalentes se dosificaron usando un primer ELISA sándwich. Los sobrenadantes también se analizaron con un ELISA de enlace en moléculas diana CD28 inmovilizadas y unidas a anticuerpos monovalentes

anti-CD28 se revelaron con anticuerpos Fc humanos etiquetados con peroxidasa. A: densidad óptica obtenida con moléculas indicadas de acuerdo con su concentración. B: tabla con curvas de regresión y el cálculo de ED50 (dosis efectiva 50), la concentración necesaria para alcanzar 50% de actividad de enlace en este ensayo.

5 Figura 9: anticuerpos monovalentes hVH/VL CD28.3 inhiben la secreción IL-2 por células T activadas. Las células T Jurkat se estimularon con superantígeno SEE y células que presentan antígeno Raji durante 48 horas, en presencia de concentraciones indicadas de anticuerpos monovalentes purificados hVH/VL bisagra corta γ 1-h γ 4CH2CH3. Los sobrenadantes se recogieron e IL-2 se midió con ELISA.

10 Figura 10: Cromatografía HP Sepharose SP (izquierda) y SDS-PAGE (derecha) bajo condiciones no reducidas después de pegilación de C96-Fabs de anticuerpo humanizado CD28.3. Ruta 1: marcador; ruta 2: carga; ruta 3: pico 1; ruta 4: pico 2; ruta 5: pico 3.

15 Figura 11: Propiedades de enlace para CD28 de hCD28.3 Fabs recombinantes con o sin mutaciones C96. El gráfico muestra la actividad de enlace (eje Y) de acuerdo con la concentración de Fab (eje X).

20 Figura 12: Cromatografía HP Sepharose SP (izquierda) y SDS-PAGE (derecha) bajo condiciones no reducidas después de pegilación de C96A-Fabs de anticuerpo humanizado CD28.3. Ruta 1: marcadores MW; ruta 2: pre-cromatografía de proteínas pegiladas; ruta 3: pico 1 que contiene el Fab monopegilado, que representa el 41% del material de inicio.

25 Figura 13: Cromatografía HP Sepharose SP (izquierda) y SDS-PAGE (derecha) bajo condiciones no reducidas después de pegilación de C96A-Fabs de anticuerpo humanizado CD28.3 con una secuencia de terminación C CAA en la cadena pesada. Ruta 1: marcadores MW; ruta 2: pre-cromatografía de proteínas pegiladas; ruta 3: pico.

EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN EUCARIÓTICA DE UN ANTICUERPO MONOVALENTE hCD28.3 (FRAGMENTO FAB).

Cadena pesada:

30 La secuencia que codifica la región VH de hCD28.3 (SEQ ID NO: 1) en fusión con la secuencia que codifica la región CH1 humana (Número de Acceso NCBI AAF03881) y con una secuencia que codifica el péptido líder de la cadena pesada del anticuerpo nativo murino hCD28.3, se sintetizó químicamente e introdujo en el vector clonador pGA18 (Geneart) para amplificación. La secuencia después se extirpó mediante digestión con enzimas de restricción KpnI/BamHI y se subclonaron en los sitios KpnI/BamHI del plásmido pcDNA3.1-hygro (Invitrogen). Los clones positivos se amplificaron y purificaron Midiprep libre de endotoxinas (Macherey-Nagel) para la etapa de transfección.

35 El plásmido resultante se designa pSeñal-VH-hCH1. Comprende una construcción que contiene la secuencia que codifica la región VH de hCD28.3 entre la secuencia que codifica el péptido líder de la cadena pesada de CD28.3 y la secuencia que codifica la región CH1 humana (Número de Acceso NCBI AAF03881). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de esta construcción se muestran en la Figura 1. También se representan como SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 en el listado secuencia adjunto.

Cadena ligera:

45 La secuencia que codifica la región VL de hCD28.3 (SEQ ID NO: 2) en fusión con la secuencia que codifica la región kappa c humana (Número de Acceso NCBI BAC01725) y con una secuencia que codifica el péptido líder de la cadena ligera del anticuerpo nativo murino hCD28.3, se sintetizó químicamente e introdujo en el vector clonador pGA18 (Geneart) para amplificación. La secuencia después se extirpó mediante digestión con enzimas de restricción KpnI/BamHI y se subclonaron en los sitios KpnI/BamHI del plásmido pcDNA3.1-hygro (Invitrogen). Los clones positivos se amplificaron y purificaron Midiprep libre de endotoxinas (Macherey-Nagel) para la etapa de transfección.

50 El plásmido resultante se designa pSeñal-VL-hCk. Comprende una construcción que contiene la secuencia que codifica la región VL de hCD28.3 entre la secuencia que codifica el péptido líder de la cadena ligera de CD28.3 y la secuencia que codifica la región kappa c humana (Número de Acceso NCBI BAC01725). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de esta construcción se muestran en la Figura 2. También se representan como SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 en el listado secuencia adjunto.

Expresión eucariótica

60 Las células COS se transfectaron con 2 μ g (cada una) pSeñal-VL-hCH1 y pSeñal-VH-hCH1 usando el kit de lipofección Fugene (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cultivos se mantuvieron durante 3 días a 37°C, dividieron en un tercio y se colocaron de vuelta en cultivo durante 3 días adicionales, después de lo cual los sobrenadantes celulares se recogieron.

65

La actividad del anticuerpo monovalente hCD28.3 se evalúa directamente en el sobrenadante mediante ELISA, como se describe en el ejemplo 2 más abajo.

EJEMPLO 2: DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE ENLACE CON FRAGMENTO hCD28.3 FAB MEDIANTE ELISA

Las propiedades de enlace del fragmento hCD28.3 Fab se han comparado con aquellas obtenidas después de transfección de células Cos con plásmidos que codifican CD28.3 Fab (no humanizados) usando dos ensayos ELISA

*Primero (ELISA sándwich), las concentraciones de los fragmentos hCD28.3 y CD28.3 Fab en los sobrenadantes del cultivo de células COS transfectadas se han determinado usando un ELISA sándwich. En resumen, los anti-CD28 Fab contenidos en los sobrenadantes primero se capturan mediante un anticuerpo policlonal de conejo, específico para dominios variables pesados y ligeros de CD28.3 (obtenidos después de inmunización de conejos con una Fv de cadena sencilla que contiene los dominios variables pesados y ligeros del CD28.3 nativo, y purificaron mediante inmunoadsorción en CD28.3 Fab-Sepharose). Las proteínas capturadas después se revelan con un anticuerpo monoclonal murino dirigido a la cadena kappa de IgG humano, seguido por un anticuerpo anti-ratón de cabra policlonal etiquetado. El anticuerpo unido se reveló mediante colorimetría usando el sustrato TMB, y se leyó en 405 nm.

La DO correspondiente a diferentes diluciones del sobrenadante se compara después con una curva estándar obtenida con cantidades conocidas de un CD28.3 Fab, llamado FR104, purificado del sobrenadante del cultivo de células CHO transformadas con técnicas estándares de cromatografía, y dosificadas con un ensayo BAC (ácido bisincronico). FR104 contiene regiones VH y VL nativas (no humanizadas) del anticuerpo CD28.3. Por lo tanto, se puede evaluar la cantidad de proteínas Fab presentes en sobrenadantes celulares.

*Segundo (ELISA de enlace), para analizar la actividad de enlace de fragmentos hCD28.3 Fab comparado con CD28.3 Faba, CD28/Fc humano quimérico (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) se usó en 2 µg/ml en amortiguador de carbonato 0,05M pH 9.2 para cubrir los pocillos (50 µl/pocillo) de placas con microtítulo (Nunc Immunoplates) durante la noche a 4°C. Estas moléculas CD28 diana inmovilizadas se enlazarán solamente con moléculas inmunorreactivas con actividad anti-CD28.

Los pocillos después se lavaron 3 veces sucesivamente con 200 µL PBS-0,05% Tween, y saturaron con 100 µL PBS Tween 0,1% BSA 1% durante 2 horas a 37°C.

A continuación, después de 3 lavados con 200 µL PBS-0,05% Tween, se añadieron los sobrenadantes que contenían las concentraciones conocidas de fragmentos de CD28.3 o hCD28.3 Fab ((50 µl/pocillo) en diferentes diluciones en PBS-0,1% Tween y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Después de 3 lavados con 200 µL PBS-0,05% Tween, se añadió un anticuerpo monoclonal dirigido a la cadena kappa de IgG humano (1/10000 diluciones) (1 hora, 37°C), seguido de anticuerpos anti-ratón de cabra conjugados con peroxidasa (1/2000 diluciones), seguido de revelación colorimétrica usando el sustrato TMB y lectura a 405 nm.

Después, los resultados se muestran como la absorbancia (eje Y) medido con el ELISA de enlace, de acuerdo con la concentración de Fab (eje X), medido con el ELISA sándwich. Se determina un CA50 (Concentración de Anticuerpo 50) después de calcular la pendiente de curva en su rango lineal como la concentración de anti-CD28 Fab necesaria para alcanzar el 50% de la densidad óptica necesaria (DO) en el ensayo de enlace.

Los resultados se muestran en la Figura 3 y la Tabla I.

La Figura 3A muestra la densidad óptica en 405 nm para mayores concentraciones de FR104, hCD28.3 Faba o CD28.3 Fab en el ELISA de enlace.

La Figura 3B muestra el cálculo de curvas de regresión, lo que permite la determinación de valores comparativos CA50.

La Tabla I más abajo resume la DO50, la ecuación y la CA50 para FR104 estándar, y los fragmentos Fab VH-tipo salvaje + VL-tipo salvaje y Fab hCD28.3.

Tabla 1

	DO50	Ecuación	CA50
Std FR104	1.792	$y = 1.1424\text{Ln}(x) - 3.6351$	115
CD28.3 Fab	1.82	$y = 0.9776\text{Ln}(x) - 3.2483$	162
hCD28.3 Fab	1.804	$y = 1.0217\text{Ln}(x) - 3.2859$	151

Estos resultados muestran que el 50% de la actividad de enlace con CD28 podría alcanzarse a una concentración similar para fragmentos Fab VH-tipo salvaje + VL-tipo salvaje (CD28.3 Fab) y hCD28.3 Fab. La concentración es ligeramente inferior para el estándar, probablemente porque se purifica antes del ensayo. Así, hCD28.3 retiene las propiedades enlace con CD28 de las secuencias de CD28 VH y VL de tipo salvaje.

EJEMPLO 3: CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN EUCARIOTICA DE UN ANTICUERPO MONOVALENTE hCD28.3 (FRAGMENTO FV-FC) CON UNA BISAGRA CORTA γ 1 Y UN DOMINIO γ 4 CH2-CH3

Cadena pesada:

La secuencia que codifica la región VH de hCD28.3 (SEQ ID NO: 1) en fusión de terminal C con la secuencia que codifica una parte de la región bisagra de IgG1 humano (SEQ ID NO: 8), con dominios CH2-CH3 de IgG4 humano (nucleótidos 787 a 1440 de la secuencia Número de Acceso NCBI BC025985) y en la posición terminal N con una secuencia que codifica el péptido líder de la cadena pesada del anticuerpo nativo murino hCD28.3, se sintetizó químicamente e introdujo en el vector clonador pMa (Geneart) para amplificación. La secuencia después se extirpó mediante digestión con enzimas de restricción NheI/EcoRI y se subclonaron en los sitios NheI/EcoRI del plásmido pCIneo (Promega). Después de transformación de células *E. coli*, los clones positivos se amplificaron y los plásmidos extraídos se purificaron mediante columnas Midiprep libres de endotoxinas (Macherey-Nagel).

El plásmido resultante se designa pSeñal-hVH-bisagra corta γ 1-h γ 4CH2-CH3. Comprende una construcción que contiene la secuencia que codifica la región VH de hCD28.3 entre la secuencia que codifica el péptido líder de la cadena pesada de CD28.3 y la secuencia que codifica una parte de la región bisagra humana γ 1 y de los dominios humanos γ 4 CH2CH3. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de esta construcción se muestran en la Figura 4. También se representan como SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 en el listado secuencia adjunto.

Cadena ligera:

La secuencia que codifica la región VL de hCD28.3 (SEQ ID NO: 2) en fusión con la secuencia que codifica una parte de la región bisagra de IgG1 humano (SEQ ID NO: 8), con dominios CH2-CH3 de IgG4 humano (nucleótidos 787 a 1440 de la secuencia Número de Acceso NCBI BC025985) y en la posición terminal N con una secuencia que codifica el péptido líder de la cadena pesada del anticuerpo nativo murino hCD28.3, se sintetizó químicamente e introdujo en el vector clonador pMa (Geneart) para amplificación. La secuencia después se extirpó mediante digestión con enzimas de restricción NheI/EcoRI y se subclonaron en los sitios NheI/EcoRI del plásmido pCIneo (Promega). Después de transformación de células *E. coli*, los clones positivos se amplificaron y los plásmidos extraídos se purificaron mediante columnas Midiprep libres de endotoxinas (Macherey-Nagel).

El plásmido resultante se designa pSeñal-hVL-bisagra corta γ 1-h γ 4CH2-CH3. Comprende una construcción que contiene la secuencia que codifica la región VL de hCD28.3 entre la secuencia que codifica el péptido líder de la cadena ligera de CD28.3 y la secuencia que codifica una parte de la región bisagra humana γ 1 y de los dominios humanos γ 4 CH2CH3. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de esta construcción se muestran en la Figura 5. También se representan como SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 en el listado secuencia adjunto.

Expresión eucariótica

Las células COS se transfectaron con 1 μ g (cada una) pSeñal-hVL- bisagra corta γ 1-h γ 4CH2-CH3 y pSeñal-hVH- bisagra corta γ 1-h γ 4CH2-CH3, usando el kit de lipofección Lipofectamine (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cultivos se mantuvieron durante 3 días a 37°C, tiempo después del cual los sobrenadantes celulares se recogieron. La actividad del anticuerpo monovalente se evalúa directamente en el sobrenadante mediante ELISA, como se describe en el ejemplo 5 más abajo.

EJEMPLO 4: CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN EUCARIOTICA DE UN ANTICUERPO MONOVALENTE hCD28.3 (FRAGMENTO FV-FC) CON UNA BISAGRA CORTA γ 1 DE LONGITUD COMPLETA Y UN DOMINIO γ 4 CH2-CH3

Cadena pesada:

La secuencia que codifica la región VH de hCD28.3 (SEQ ID NO: 1) en fusión de terminal C con la secuencia que codifica una parte de la región bisagra de IgG1 humano (SEQ ID NO: 7), con dominios CH2-CH3 de IgG4 humano (nucleótidos 787 a 1440 de la secuencia Número de Acceso NCBI BC025985) y en la posición terminal N con una secuencia que codifica el péptido líder de la cadena pesada del anticuerpo nativo murino hCD28.3, se sintetizó químicamente e introdujo en el vector clonador pMa (Geneart) para amplificación. La secuencia después se extirpó mediante digestión con enzimas de restricción NheI/EcoRI y se subclonaron en los sitios NheI/EcoRI del plásmido pCIneo (Promega). Después de transformación de células *E. coli*, los clones positivos se amplificaron y los plásmidos extraídos se purificaron mediante columnas Midiprep libres de endotoxinas (Macherey-Nagel).

El plásmido resultante se designa pSeñal-hVH-bisagra completa γ 1-h γ 4CH2-CH3. Comprende una construcción que contiene la secuencia que codifica la región VH de hCD28.3 entre la secuencia que codifica el péptido líder de la cadena pesada de CD28.3 y la secuencia que codifica una parte de la región bisagra humana γ 1 y de los dominios humanos γ 4 CH2CH3. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de esta construcción se muestran en la Figura 6. También se representan como SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 en el listado secuencia adjunto.

Cadena ligera:

La secuencia que codifica la región VL de hCD28.3 (SEQ ID NO: 2) en fusión con la secuencia que codifica una parte de la región bisagra de longitud completa de IgG1 humano (SEQ ID NO: 7), con dominios CH2-CH3 de IgG4 humano (nucleótidos 787 a 1440 de la secuencia Número de Acceso NCBI BC025985) y en la posición terminal N con una secuencia que codifica el péptido líder de la cadena pesada del anticuerpo nativo murino hCD28.3, se sintetizó químicamente e introdujo en el vector clonador pMa (Geneart) para amplificación. La secuencia después se extirpó mediante digestión con enzimas de restricción NheI/EcoRI y se subclonaron en los sitios NheI/EcoRI del plásmido pCIneo (Promega). Después de transformación de células *E. coli*, los clones positivos se amplificaron y los plásmidos extraídos se purificaron mediante columnas Midiprep libres de endotoxinas (Macherey-Nagel).

El plásmido resultante se designa pSeñal-hVL-bisagra completa γ 1-h γ 4CH2-CH3. Comprende una construcción que contiene la secuencia que codifica la región VL de hCD28.3 entre la secuencia que codifica el péptido líder de la cadena ligera de CD28.3 y la secuencia que codifica la región bisagra de longitud completa humana γ 1 y de los dominios humanos γ 4 CH2CH3. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de esta construcción se muestran en la Figura 7. También se representan como SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 en el listado secuencia adjunto.

Expresión eucariótica

Las células COS se transfectaron con 1 μ g (cada una) pSeñal-hVL- bisagra completa γ 1-h γ 4CH2-CH3 y pSeñal-hVH- bisagra completa γ 1-h γ 4CH2-CH3, usando el kit de lipofección Lipofectamine (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cultivos se mantuvieron durante 3 días a 37°C, tiempo después del cual los sobrenadantes celulares se recogieron. La actividad del anticuerpo monovalente se evalúa directamente en el sobrenadante mediante ELISA, como se describe en el ejemplo 5 más abajo.

EJEMPLO 5: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENLACE DE ANTICUERPOS MONOVALENTES DE DOMINIOS HCD28.3-BISAGRA LONGITUD COMPLETA γ 1 γ 4CH2-CH3 Y DOMINIOS HCD28.3-BISAGRA CORTA γ 1 γ 4CH2-CH3 MEDIANTE ELISA

Las propiedades de enlace de los anticuerpos monovalentes hCD28.3 de dominios hCD28.3-bisagra completa γ 1 γ 4 CH2-CH3 y hCD28.3-bisagra corta γ 1 γ 4 CH2-CH3 producidos mediante células COS transfectadas se han analizado usando dos ensayos ELISA.

*Primero (ELISA sándwich), las concentraciones de los anticuerpos monovalentes hCD28.3 en los sobrenadantes del cultivo de células COS transfectadas se han determinado usando un ELISA sándwich. En resumen, los anticuerpos monovalentes contenidos en los sobrenadantes primero se capturan mediante un anticuerpo policlonal de cabra dirigido a IgG humano. Las proteínas capturadas después se revelan con un anticuerpo específico Fc, IgG anti-humano policlonal de cabra biotinilado, y después una estreptavidina conjugada con peroxidasa. El anticuerpo unido se reveló mediante colorimetría usando el sustrato TMB, y se leyó en 405 m.

La DO correspondiente a diferentes diluciones del sobrenadante se compara después con una curva estándar obtenida con cantidades conocidas de anticuerpos monovalentes hCD28.3, purificados del sobrenadante del cultivo de células CHO transformadas con técnicas estándares de cromatografía, y dosificadas con un ensayo BAC (ácido bisincronico).

*Segundo (ELISA de enlace), para analizar la actividad de enlace de anticuerpos monovalentes hCD28.3, CD28/Fc humano quimérico (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) se usó en 2 μ g/ml en amortiguador de carbonato 0,05M pH 9.2 para cubrir los pocillos (50 μ l/pocillo) de placas con microtítulo (Nunc Immunoplates) durante la noche a 4°C. Estas moléculas CD28 diana inmovilizadas se enlazarán solamente con moléculas inmunorreactivas con actividad anti-CD28.

Los pocillos después se lavaron 3 veces sucesivamente con 200 μ L PBS-0,05% Tween, y saturaron con 100 μ L PBS Tween 0,1% BSA 1% durante 2 horas a 37°C.

A continuación, después de 3 lavados con 200 μ L PBS-0,05% Tween, se añadieron los sobrenadantes que contenían las concentraciones conocidas de los anticuerpos monoclonales que se analizarán (50 μ l/pocillo) en diferentes diluciones en PBS-0,1% Tween y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Después de 3 lavados con 200 μ L PBS-0,05% Tween, se añadió (1/500 diluciones; 1 hora, 37°C) un antisuero policlonal de conejo, específico para los dominios variables pesados y ligeros de CD28.3 (obtenido después de inmunización de conejos con una cadena Fv sencilla que contenía los dominios variables pesados y ligeros de CD28.3 nativo, y purificado mediante inmunoadsorción en CD28.3 Fab-Sepharose). Esto fue seguido de anticuerpos anti-conejo burro conjugados con peroxidasa (1/2000 diluciones) seguido de revelación colorimétrica usando el sustrato TMB y lectura a 405 nm.

Después, los resultados se muestran como la absorbancia (eje Y) medido con el ELISA de enlace, de acuerdo con la concentración del anticuerpo monovalente (eje X), medido con el ELISA sándwich. Se determina una CA50 (Concentración de Anticuerpo 50) después de calcular la pendiente de la curva en su rango lineal como la concentración de anticuerpo monoclonal necesaria para alcanzar el 50% de la densidad óptica necesaria (DO) en el ensayo de enlace.

La Figura 8 compara las actividades de enlace de anticuerpos monovalentes de dominios hCD28.3 bisagra completa IgG1 IgG4CH2-CH3 con dominios hCD28.3 bisagra corta IgG1 IgG4CH2-CH3 en el ELISA de enlace (Figura 8A).

La Figura 8B resume la ecuación, el factor de regresión y la CA50 para anticuerpos monovalentes.

Estos resultados muestran que el 50% de la actividad de enlace con CD28 podría alcanzarse a una concentración similar para anticuerpos monovalentes de dominios hCD28.3-bisagra completa γ 1 γ 4 CH2-CH3 o dominios hCD28.3-bisagra corta γ 1 γ 4 CH2-CH3.

EJEMPLO 6: ANTICUERPOS MONOVALENTES hCD28.3 PREVIENEN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULA T

Para verificar que el anticuerpo monovalente hCD28.3 bloquea la activación de célula T dependiente de CD28, se estimularon células T humanas (células Jurkat) con superantígeno SEE presentado por la línea celular B Raji. La endotoxina SEE, cuando se presente a la línea RJ1 de linfoblastoide celular B positivo clase II, activa la línea Jurkat de célula T que expresa V β 8 para secretar IL-2 (Herman et al., 1990, J. Exp. Med. 172:709). Ya que las células Jurkat expresan un alto nivel de CD28 y las células Raji expresan CD80/86, esta reacción es parcialmente dependiente de CD28. Cuando se mide la síntesis de interleuquina-2 en este ensayo mediante ELISA (kit ELISA MaxTM Set Deluxe Human IL-2; Biolegend #431805) después de 48 horas, en presencia de mayores concentraciones de dominios hVH/VL CD28.3-bisagra corta γ 1 γ 4CH2-CH3.

Los resultados se muestran en la Figura 9. Revelan que los anticuerpos monovalentes hCD28.3 reducen la síntesis de IL-2 por células T de una manera dependiente de dosis.

EJEMPLO 7: PREPARACIÓN DE UN ANTICUERPO MONOVALENTE hCD28.3 PEGILADO

Un fragmento hCD28.3 Fab preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1 se pegiló con PEG 40 KDa activado con maleimida usando condiciones estándares para reducción y PEGilación.

En resumen, los fragmentos de anticuerpo Fab se concentraron en 1 mg/mL y después se diafiltró contra 20 mM fosfato de sodio, 2 mM EDTA y pH 7,0. Los fragmentos de anticuerpo Fab' se redujeron después por la adición de cloruro de cisteamina en una proporción equivalente molar = 30:1 a temperatura ambiente. Después de 5 horas, la solución se aplicó a una columna para desalar. Se disolvió glicol de polietileno (PEG) (Sunbright GL2 400MA, NOF Corporation) en 20 mM Fosfato, 2 mM EDTA, pH 7,0 para dar 9% (p/p) solución. La solución Fab desalada y PEG se mezclaron en una proporción equivalente molar = 1:1,5 y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de la PEGilación, el Fab-peg se purificó mediante cromatografía usando medio HP SP Sepharose. La proteína diana se eluyó con un gradiente de sal de 0 a 1 M NaCl. Los picos eluidos se analizaron mediante SDS-PAGE. El pico 2 representó material monopegilado, pico 2 material no pegilado y pico 3 material polipegilado.

Los resultados se muestran en la Figura 10.

Estos resultados muestran que una parte significativa de las proteínas Fab de CD28.3 mAb presenta un perfil de pegilación perturbado que da como resultado una producción de Fabs monopegilados de aproximadamente 5% solamente (pico 1).

El CD28.3 mAb contiene un residuo de cisteína (C96) que no está acoplado en puentes de disulfuro intra o inter-cadena, en la posición 96 de la cadena ligera de dominio variables. La cisteína libre poseerá una mayor reactividad que los residuos de cisteína acoplados en los puentes de disulfuro y por lo tanto serán preferentemente

objetivos de pegs activados con maleimida. Por lo tanto, es posible que una segunda pegilación no deseada ocurra en este residuo.

5 Para resolver este problema se realizó un estudio de mutación de VL-C96 para determinar si era posible sustituir el residuo C96 por otro aminoácido sin modificar las propiedades de enlace del anticuerpo.

10 Se construyeron códigos de plásmido para Fabs anti-CD28.3 humanizado con C96 no modificado en la cadena ligera, o con C96 para mutaciones A, G, S, V, T o R y se transfectaron a células COS mediante lipofección, como se desvela en el Ejemplo 1. Los sobrenadantes celulares primero se analizaron mediante ELISA sándwich para determinar la concentración total de Fab, como se desvela en el Ejemplo 2. Después, los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA para determinar la actividad de enlace en CD28 recombinante inmovilizado, como se desvela en el Ejemplo 2.

15 Los resultados se muestran en la Figura 11. Estos resultados muestran que, a diferencia de otras sustituciones analizadas, las sustituciones con C96A dieron como resultado un anticuerpo completamente activo y que la sustitución por C96N dio como resultado solamente una reducción moderada de actividad.

20 La variante del fragmento Fab C96A se pegiló y purificó mediante cromatografía como se ha descrito anteriormente. La pre-cromatografía de proteínas pegiladas y los picos de elución se analizaron mediante SDS-Page. Los resultados se muestran en la Figura 12. El pico 1 representa material monopegilado.

Estos resultados muestran que el fragmento Fab C96A puede pegilarse con una eficacia que alcanza el 41% (Figura 12).

25 Ventaja del extremo CAA en terminal C de la cadena pesada. El medio molecular inmediato de una cisteína libre podría modificar su accesibilidad para pegilación de maleimida y por lo tanto modificar la producción de la reacción de pegilación. Una posible opción para la cisteína de terminal C es ser el último aminoácido de la cadena pesada. Otra opción es la adición de "aminoácidos sustancia" en la posición de terminal C, después de la última cisteína. Por lo tanto, se comparó la eficacia de pegilación de una molécula Fab' de la variante C96A de CD28.3 humanizado Mab con la cisteína de terminal C que es el último aminoácido de la cadena pesada (variante C; datos mostrados en la Figura 12) con una molécula similar con la última cisteína de terminal C seguida por dos alaninas (variante CAA). Los datos demostraron claramente y reproduciblemente que la variante CAA podía pegilarse con un 20% más de eficacia (Figura 13). De hecho, la producción de pegilación que fue del 41% para la variante C96A alcanzó el 52% para la variante C96A-CAA.

35 **LISTADO DE SECUENCIAS**

40 <110> TcL PHARMA
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
 MARY, Caroline
 POIRIER, Nicolas
 VANHOVE, Bernard

45 <120> ANTICUERPOS HUMANIZADOS ANTI-CD28

<130> MJP/11 – f2173/3 WO

<150> EP 10290080.0

<151> 2010-02-18

50 <160> 16

<170> PatentIn Versión 3.5

55 <210> 1
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60

65

ES 2 680 570 T3

<220>

<223> hCD28.3 VH

<400> 1

5

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

10

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

15

Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

20

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

25

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

30

Glu Leu Thr Gly Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

35

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

40

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

45

<213> Secuencia Artificial

50

55

60

65

ES 2 680 570 T3

<220>
<223> hCD28.3 VL

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (96)..(96)
<223> Xaa = Cys, Ala, or Asn

10 <400> 2

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

15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

20 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

25 Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

30 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

35 Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Xaa
85 90 95

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

<210> 3

<211> 750
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Señal- VH-hCH1

50 <400> 3
atggaatggt gctgggtcctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaactccaag 60
gtccaactgc agcagctctgg agctgagctg aagaaccgg gggcgtcggg gaaagtctcc 120
55 tgcaaggcgt ctggttacac cttcactgaa tatattatac actggataaa gctgaggtct 180
ggacagggtc ttgagtggat tgggtggttt taccctggaa gtaatgatat acagtacaat 240
gcgcaattca agggcaaggc cacattgact gcggaacaat cctccagcac cgtctatatg 300
gaacttactg gattgacacc cgaggactct gcggtctatt tttgtgcaag acgcgacgat 360
60 ttctctggtt acgacgcctt tccttactgg ggccaagggg ctctggtcac tgtctctgca 420
gctagcacca agggcccctc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 480

65

ES 2 680 570 T3

5 ggcacagcgg cccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 540
 tggaaactcag ggcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca 600
 ggactctact cccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660
 10 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 720
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgctaa 750

15 <210> 4
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Señal- VH-hCH1

 <400> 4

25 Met Glu Trp Cys Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

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

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

35 Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

40 Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn
 65 70 75 80

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

45 Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

50 Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro
 115 120 125

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

55 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

60 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

65

ES 2 680 570 T3

5 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

10 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

15 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
 245 250

20 <210> 5
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Señal- VI-hCkappa

30 <400> 5
 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccatcttcc ctatctgcat ctgtgggaga cagggtcacc 120
 atcacgtgta aaacaaatga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaagac 180
 35 ggaanaatctc ctcagctcct gatctatgct gcaacacact tagtagaggg tgtgccatca 240
 aggttcagtg gcagtggtatc aggcacacag tattccctca caatcagcag cctgcagcca 300
 gaagattttg ggaattatta ctgtcaacac ttttggggta ctccgtgcac gttcggaggg 360
 40 gggaccaagc tggaaataaa acggacggtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcc 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taactctat 480
 ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 45 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgagc 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagttcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtaa 705

50 <210> 6
 <211> 234
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Señal- VI-hCkappa

60 <220>

65

<221> MISC_FEATURE
 <222> (116)..(116)
 <223> Xaa = Cys or Ala
 5 <400> 6
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 10 Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 15 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Asn Glu Asn
 35 40 45
 20 Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp Gly Lys Ser Pro
 50 55 60
 25 Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 30 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 35 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110
 40 Gly Thr Pro Xaa Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 45 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 50 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 55 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 60 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 65 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

5 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

10 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pr
 1 5 10 15

15 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

20 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

25 <210> 9
 <211> 1107
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> hVLCD28.3 – bisagra corta gamma1- hgamma4CH2CH3

35 <400> 9
 atggaatggt gctgggtggt cctgttctctg ctgtccgtga ccgctggcgt gcactccaag 60
 caggtgcagc tgcagcagtc tggcgcggag ctgaagaagc ctggcgcctc cgtcaaggtg 120
 tcttgcaagg cctccggcta caccttcacc gagtacatca tccactggat caagctgaga 180
 tccggccagg gcctggaatg gatcggtctg ttctaccctg gctccaacga catccagtac 240
 aacgccagc tcaagggcaa ggccaccctg accgcgcaca agtctctctc caccgtgtac 300
 atggaactga ccggcctgac ccctgaggac tccgcctgtt acttctgctc caggcgggac 360
 gacttctctg gctacgagc cctgccttat tggggccagg gcaccctggt gaccgtgtcc 420
 gccgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg agttctctggg gggaccatca 480
 gtcttctctg tcccccaaaa acccaaggac actctcatga tctcccgac cctgaggtc 540
 acgtgcgtgg tgggtggact gagccaggaa gaccocgagg tccagttcaa ctggtacgtg 600
 gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 660
 tacctgtggt tcagcgtcct caccgtctct caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 720
 aagtgcgaag tctccaacaa aggctcccg tctccatctg agaaaacct ctccaaagcc 780
 aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 840
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggtctct accccagoga catcgccgtg 900
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
 tccgacggct ccttcttctc ctacagcagg ctaccctgtg acaagagcag gtggcaggag 1020

65

ES 2 680 570 T3

5 gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacacagaag 1080
 agcctctccc tgtctctggg taaatga 1107

10 <210> 10
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> hVLCD 28.3 – bisagra corta gamma1- hgamma4CH2CH3

 <400> 10

20 Met Glu Trp Cys Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

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

25 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 35 40 45

30 Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly
 50 55 60

35 Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr
 65 70 75 80

40 Asn Ala Gln Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
 85 90 95

45 Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala
 100 105 110

50 Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu
 115 120 125

55 Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Asp Lys Thr
 130 135 140

 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 145 150 155 160

60 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 165 170 175

 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 180 185 190

65 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

ES 2 680 570 T3

			195					200					205			
5	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	210						215					220				
10	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
	225					230					235					240
15	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr
					245					250					255	
20	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
				260					265					270		
25	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
			275					280					285			
30	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	290						295					300				
35	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
	305					310					315					320
40	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
					325					330					335	
45	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
				340				345						350		
50	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys
			355					360					365			

45

<210> 11
 <211> 1068
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> hVLC28.3 – bisagra corta gamma1- hgamma4CH2CH3

55

<400> 11

60

65

ES 2 680 570 T3

<400> 12

5 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

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

10 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Asn Glu Asn
35 40 45

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

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

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

25 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
100 105 110

Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

30 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
130 135 140

35 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
145 150 155 160

40 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
165 170 175

45 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
180 185 190

50 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
195 200 205

55 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
210 215 220

60 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
225 230 235 240

65

ES 2 680 570 T3

<400> 13
 atggaatggg gctgggtggt cctgttcctg ctgtccgtga ccgctggcgt gcaactccaag 60
 5 caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctgaagaagc ctggcgccctc cgtcaagggtg 120
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gagtacatca tccactggat caagctgaga 180
 tccggccagg gcctggaatg gatcggctgg ttctaccctg gctccaacga catccagtac 240
 10 aacgcccagt tcaagggcaa gggcaccctg accgcccaca agtcctcctc cacogtgtac 300
 atggaactga cggcctgac ccctgaggac tccgcccgtg acttctgogc caggcggggac 360
 15 gacttctctg gctacgacgc cctgccttat tggggccagg gcaccctggg gaccgtgtcc 420
 gccgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgagttc 480
 ctgggggggac catcagttct cctgttcccc ccaaaaaccca aggacactct catgatctcc 540
 20 cggacccctg aggtcacgtg cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagacc cagaggtccag 600
 ttcaactggg acgtggatgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 660
 25 cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtccctcaccg tcctgcacca ggactggctg 720
 aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaaggcc tcccgtcctc catcgagaaa 780
 accatctcca aagccaaagg gcagcccoga gagccacagg tgtacacct gcccccattc 840
 30 caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc 900
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 960
 35 cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaggctcac cgtggacaag 1020
 agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1080
 cactacacac agaagagcct ctccctgtct ctgggtaaat ga 1122

40

<210> 14
 <211> 373
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> hVLCD28.3 – bisagra completa gamma1- hgamma4CH2CH3

50

<400>14

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

ES 2 680 570 T3

5 Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly
50 55 60

10 Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr
65 70 75 80

15 Asn Ala Gln Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
85 90 95

20 Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala
100 105 110

25 Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu
115 120 125

30 Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Glu Pro Lys
130 135 140

35 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
145 150 155 160

40 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
165 170 175

45 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
180 185 190

50 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
195 200 205

55 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
210 215 220

60 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
225 230 235 240

65 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
245 250 255

70 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
260 265 270

75 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
275 280 285

80 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
290 295 300

ES 2 680 570 T3

5 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
305 310 315 320

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
325 330 335

10 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
340 345 350

15 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
355 360 365

20 Leu Ser Leu Gly Lys
370

<210> 15
<211> 1083
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
30 <223> hVLCD28.3 – bisagra completa gamma1- hgamma4CH2CH3
<400> 15

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 680 570 T3

	atgtccgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc	60
	gacatccaga tgaccagtc cccctectcc ctgtctgcct ccgtgggcga ccgggtgacc	120
5	atcacctgta agaccaacga gaacatctac tccaacctgg cctggtatca gcagaaggac	180
	ggcaagtccc ctcagctgct gatctacgcc gccacccatc tggaggagg cgtgccctct	240
10	agattctccg gctccggctc tggcaccag tactccctga ccatcagctc cctgcagcct	300
	gaggacttcg gcaactacta ctgccagcac ttctggggca ccccttgtag cttcggcgga	360
	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgggagccc aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca	420
15	ccgtgccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagctc tcctgttccc cccaaaacc	480
	aaggacactc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc	540
20	caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggagg gcataatgcc	600
	aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc	660
	gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggctc caacaaaggc	720
25	ctcccgctct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agagccacag	780
	gtgtacaccc tgccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	840
	ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	900
30	gagaacaact acaagaccac gcctcccgct ctggactccg acggctcctt cttcctctac	960
	agcaggctca ccgtggacaa gagcagggtg caggagggga atgtcttctc atgctccgtg	1020
35	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa	1080
	tga	1083

40 <210> 16
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> hVLCD28.3 – bisagra completa gamma1- hgamma4CH2CH3
 <220> 16

50

55

60

65

ES 2 680 570 T3

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

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110

Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 130 135 140

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 165 170 175

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 195 200 205

ES 2 680 570 T3

5 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

10 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
225 230 235 240

15 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

20 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
260 265 270

25 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

30 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

35 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

40 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
325 330 335

45 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

50 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
355 360

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo anti-CD28 que tiene un sitio de enlace consistente en:
 - un primer dominio variable (también aquí definido como “dominio variable de cadena pesada”) definido por la siguiente secuencia:

10 VQLQQSGAELKKPGASVKVSKASGYTFTEYIIHWIKLRSGQGLEWIGWFYP
 GSNDIQYNAQFKGKATLTADKSSSTVYMELTGLTPEDSAVYFCARRDDFSGY
 DALPYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:1),

15 donde dicho dominio variable puede además comprender opcionalmente un residuo Q en su extremo de terminal N;
 - un segundo dominio variable (también aquí definido como “dominio variable de cadena ligera”) definido por la siguiente secuencia:

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKTNENIYSNLAWYQQKDGKSPQLLIYAATH
 LVEGVPSRFSGSGSGTQYSLTISSLQPEDFGNYQCQHFWGTPXTFGGGTKLEI

25 KR, donde X = C o A.

- 2. Un anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monovalente.
- 3. Un anticuerpo monovalente de la reivindicación 2, que es un heterodímero de:
 - 30 - una primera cadena de proteínas que tiene la secuencia de aminoácidos 21-251 de SEQ ID NO: 4;
 - una segunda cadena de proteínas que tiene la secuencia de aminoácidos 21-234 de SEQ ID NO: 6.
- 4. Un anticuerpo monovalente de la reivindicación 3 donde la segunda cadena de proteínas comprende un dominio variable de SEQ ID NO: 2 donde X representa un residuo de alanina.
- 35 5. Un anticuerpo monovalente de la reivindicación 4 que está pegilado.
- 6. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 40 7. Una composición terapéutica que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 8. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de una condición patológica seleccionada del grupo consistente en rechazo a trasplante, vasculopatía crónica de aloinjerto, enfermedad injerto contra huésped, enfermedades autoinmunes mediadas por linfocito T, hipertensión, fenómenos alérgicos y enfermedades inflamatorias crónicas.

45

50

55

60

65

8
 ATG GAA TGG TGC TGG GTC TTT CTC TTC CTC CTC TCA GTA ACT GCA GGT GTC CAC TCC AAG GTC CAA CTG CAG CAG TCT GGA GCT
 M E W C W V F L F L L L S V T A G V H S K V Q L Q Q S G A
 1
 9
 GAG CTG AAG AAA CCC GGG GCG TCG GTG AAA GTC TCC TGC AAG GCG TCT GGT TAC ACC TTC ACT GAA TAT ATT ATA CAC TGG ATA AAG
 E L K K P G A S V K M S C K A S G Y T F T E Y I I H W I K
 37
 V12K R19K L20V
 38
 CTG AGG TCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGG TGG TTT TAC CCT GGA AGT AAT GAT ATA CAG TAC AAT GCG CAA TTC AAG GGC AAG
 L R S G Q G L E W I G W F Y P G S N D I Q Y N A Q F K G K
 K62Q
 66
 67
 GCC ACA TTG ACT GCG GAC AAA TCC TCC AGC ACC GTC TAT ATG GAA CTT ACT GGA TTG ACA OCC GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTT TGT
 A T L T A D K S S S T V Y M E L T G L T E D S A V Y F C
 95
 96
 GCA AGA CGC GAC GAT TTC TCT GGT TAC GAC GCC CTT CCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GCT AGC ACC AMG
 A R R D D F S G Y D A L P Y W G Q G T L V T V S A A S T K
 124
 125
 GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCG TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC
 G P S V F P L A P S S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F
 153
 154
 CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAG ACC TTC CCG GGT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC
 P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L
 182
 183
 TAC TCC CTC AGC AGC GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC
 Y S L S S V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N
 211
 212
 ACC AAG GTG GAC AAG AAA Gtt GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC GCC GCA TAA
 T K V D K K V E P K S C D K T H T C A A Stop
 231

Figura 1

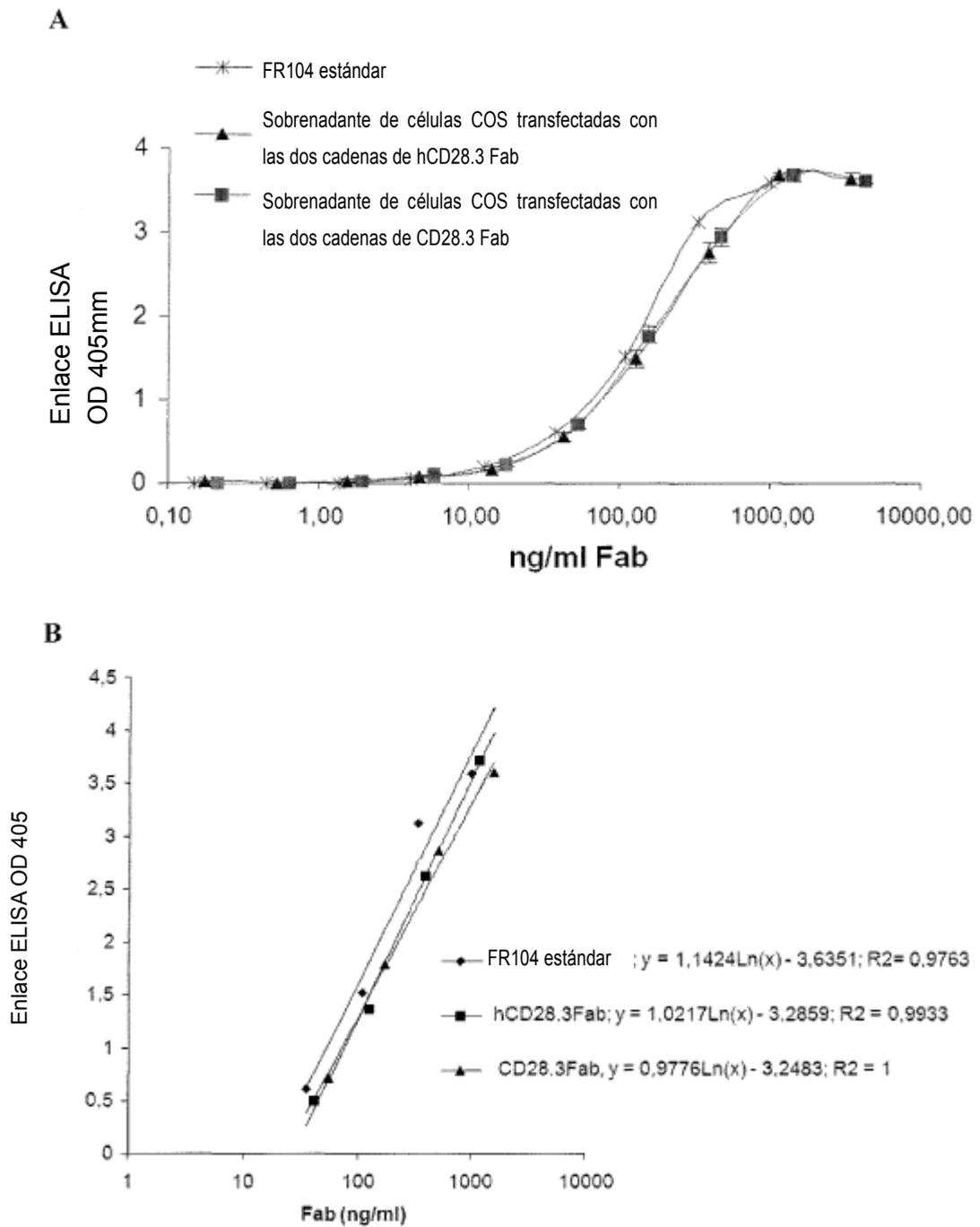


Figura 3

ES 2 680 570 T3

```

1   ATG GAA TGG TGC TGG GTG TTC CTG TTC CTG CTG TCC GTG ACC GCT   45
1   Met Glu Trp Cys Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala   15

46  GGC GTG CAC TCC AAG CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGC GCC GAG   90
16  Gly Val His Ser Lys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu   30

91  CTG AAG AAG CCF GGC GCC TCC GTC AAG GTG TCC TGC AAG GCC TCC   135
31  Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser   45

136 GGC TAC ACC TTC ACC GAG TAC ATC ATC CAC TGG ATC AAG CTG AGA   180
46  Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg   60

181 TCC GGC CAG GGC CTG GAA TGG ATC GGC TGG TTC TAC CCT GGC TCC   225
61  Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser   75

226 AAC GAC ATC CAG TAC AAC GCC CAG TTC AAG GGC AAG GCC ACC CTG   270
76  Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Gln Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu   90

271 ACC GCC GAC AAG TCC TCC TCC ACC GTG TAC ATG GAA CTG ACC GGC   315
91  Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly   105

316 CTG ACC CCT GAG GAC TCC GCC GTG TAC TTC TGC GCC AGG CGG GAC   360
106 Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp   120

361 GAC TTC TCT GGC TAC GAC GCC CTG CCT TAT TGG GGC CAG GGC ACC   405
121 Asp Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr   135

406 CTG GTG ACC GTG TCC GCC GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC   450
136 Leu Val Thr Val Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys   150

451 CCA GCA CCF GAG TTC CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC   495
151 Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro   165

496 CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC   540
166 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val   180

541 ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG GTC CAG   585
181 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln   195

586 TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA   630
196 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr   210

631 AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC   675
211 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser   225

676 GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC   720
226 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr   240

721 AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC GAG AAA   765
241 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys   255

766 ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC   810
256 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr   270

811 ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC   855
271 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser   285

856 CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG   900
286 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val   300

901 GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG   945
301 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr   315

946 CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG   990
316 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg   330

991 CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA   1035
331 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser   345

1036 TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG   1080
346 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys   360

1081 AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA   1107
361 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys End

```

Figura 4

ES 2 680 570 T3

```

1   ATG TCC GTG CCT ACC CAG GTG CTG GGA CTG CTG CTG CTG TGG CTG 45
1   Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu 15
46  ACC GAC GCC AGA TGC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCC CCC TCC TCC 90
16  Thr Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser 30
91  CTG TCT GCC TCC GTG GGC GAC CGG GTG ACC ATC ACC TGT AAG ACC 135
31  Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr 45
136 AAC GAG AAC ATC TAC TCC AAC CTG GCC TGG TAT CAG CAG AAG GAC 180
46  Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp 60
181 GGC AAG TCC CCT CAG CTG CTG ATC TAC GCC GCC ACC CAT CTG GTG 225
61  Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val 75
226 GAG GGC GTG CCC TCT AGA TTC TCC GGC TCC GGC TCT GGC ACC CAG 270
76  Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln 90
271 TAC TCC CTG ACC ATC AGC TCC CTG CAG CCT GAG GAC TTC GGC AAC 315
91  Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asn 105
316 TAC TAC TGC CAG CAC TTC TGG GGC ACC CCT TGT ACC TTC GGC GGA 360
106 Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly 120
361 GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAG CGG GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA 405
121 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro 135
406 CCG TGC CCA GCA CCT GAG TTC CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG 450
136 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 150
451 TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT 495
151 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 165
496 GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC CTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG 540
166 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu 180
541 GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC 585
181 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala 195
586 AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG 630
196 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val 210
631 GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG 675
211 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 225
676 GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC 720
226 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile 240
721 GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG 765
241 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Gln Pro Gln 255
766 GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG 810
256 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln 270
811 GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC 855
271 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 285
856 GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG 900
286 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 300
901 ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC 945
301 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 315
946 AGC AGG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC 990
316 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val 330
991 TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA 1035
331 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 345
1036 CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA 1068
346 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys End

```

Figura 5

ES 2 680 570 T3

1	ATG GAA TGG TGC TGG GTG TTC CTG TTC CTG CTG TCC GTG ACC GCT	45
1	Met Glu Trp Cys Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala	15
46	GGC GTG CAC TCC AAG CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGC GCC GAG	90
16	Gly Val His Ser Lys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu	30
91	CTG AAG AAG CCT GGC GCC TCC GTC AAG GTG TCC TGC AAG GCC TCC	135
31	Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser	45
136	GGC TAC ACC TTC ACC GAG TAC ATC ATC CAC TGG ATC AAG CTG AGA	180
46	Gly Tyr Thr Phe <u>Thr Glu Tyr Ile Ile</u> His Trp Ile Lys Leu Arg	60
181	TCC GGC CAG GGC CTG GAA TGG ATC GGC TGG TTC TAC CCT GGC TCC	225
61	Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp <u>Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser</u>	75
226	AAC GAC ATC CAG TAC AAC GCC CAG TTC AAG GGC AAG GCC ACC CTG	270
76	<u>Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Gln Phe</u> Lys Gly Lys Ala Thr Leu	90
271	ACC GCC GAC AAG TCC TCC TCC ACC GTG TAC ATG GAA CTG ACC GGC	315
91	Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly	105
316	CTG ACC CCT GAG GAC TCC GCC GTG TAC TTC TGC GCC AGG CGG GAC	360
106	Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys <u>Ala Arg Arg Asp</u>	120
361	GAC TTC TCT GGC TAC GAC GCC CTG CCT TAT TGG GGC CAG GGC ACC	405
121	<u>Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr</u>	135
406	CTG GTG ACC GTG TCC GCC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC	450
136	Leu Val Thr Val Ser Ala <u>Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His</u>	150
451	ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAG TTC CTG GGG GGA CCA TCA	495
151	<u>Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser</u>	165
496	GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC	540
166	<u>Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser</u>	180
541	CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA	585
181	<u>Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu</u>	195
586	GAC CCC GAG GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG	630
196	<u>Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val</u>	210
631	CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG	675
211	<u>His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr</u>	225
676	TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG	720
226	<u>Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu</u>	240
721	AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG	765
241	<u>Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro</u>	255
766	TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA	810
256	<u>Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg</u>	270
811	GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC	855
271	<u>Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr</u>	285
856	AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC	900
286	<u>Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro</u>	300
901	AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC	945
301	<u>Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asp Gly Gln Pro Glu Asn</u>	315
946	AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC	990
316	<u>Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe</u>	330
991	TTC CTC TAC AGC AGG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG	1035
331	<u>Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu</u>	345
1036	GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC	1080
346	<u>Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn</u>	360
1081	CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA	1122
361	<u>His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys End</u>	

Figura 6

ES 2 680 570 T3

1	ATG TCC GTG CCT ACC CAG GTG CTG GGA CTG CTG CTG CTG TGG CTG	45
1	Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu	15
46	ACC GAC GCC AGA TGC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCC CCC TCC TCC	90
16	Thr Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser	30
91	CTG TCT GCC TCC GTG GGC GAC CGG GTG ACC ATC ACC TGT AAG ACC	135
31	Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr	45
136	AAC GAG AAC ATC TAC TCC AAC CTG GCC TGG TAT CAG CAG AAG GAC	180
46	Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp	60
181	GGC AAG TCC CCT CAG CTG CTG ATC TAC GCC GCC ACC CAT CTG GTG	225
61	Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr <u>Ala Ala Thr His Leu Val</u>	75
226	GAG GGC GTG CCC TCT AGA TTC TCC GGC TCC GGC TCT GGC ACC CAG	270
76	<u>Glu Gly</u> Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln	90
271	TAC TCC CTG ACC ATC AGC TCC CTG CAG CCT GAG GAC TTC GGC AAC	315
91	Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asn	105
316	TAC TAC TGC CAG CAC TTC TGG GGC ACC CCT TGT ACC TTC GGC GGA	360
106	Tyr Tyr Cys Gln <u>His Phe Trp Gly Thr Pro Cys</u> Thr Phe Gly Gly	120
361	GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAG CGG GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA	405
121	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg <u>Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys</u>	135
406	ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAG TTC CTG GGG GGA	450
136	<u>Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro</u> <u>Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly</u>	150
451	CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG	495
151	<u>Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met</u>	165
496	ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC	540
166	<u>Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser</u>	180
541	CAG GAA GAC CCC GAG GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG	585
181	<u>Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val</u>	195
586	GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC	630
196	<u>Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn</u>	210
631	AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC	675
211	<u>Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp</u>	225
676	TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC	720
226	<u>Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly</u>	240
721	CTC CCG TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG	765
241	<u>Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln</u>	255
766	CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG	810
256	<u>Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu</u>	270
811	ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC	855
271	<u>Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe</u>	285
856	TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG	900
286	<u>Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro</u>	300
901	GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC	945
301	<u>Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly</u>	315
946	TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG	990
316	<u>Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp</u>	330
991	CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG	1035
331	<u>Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu</u>	345
1036	CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA	1080
346	<u>His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys</u>	360
1081	TGA 1083	
361	End	

Figure 7

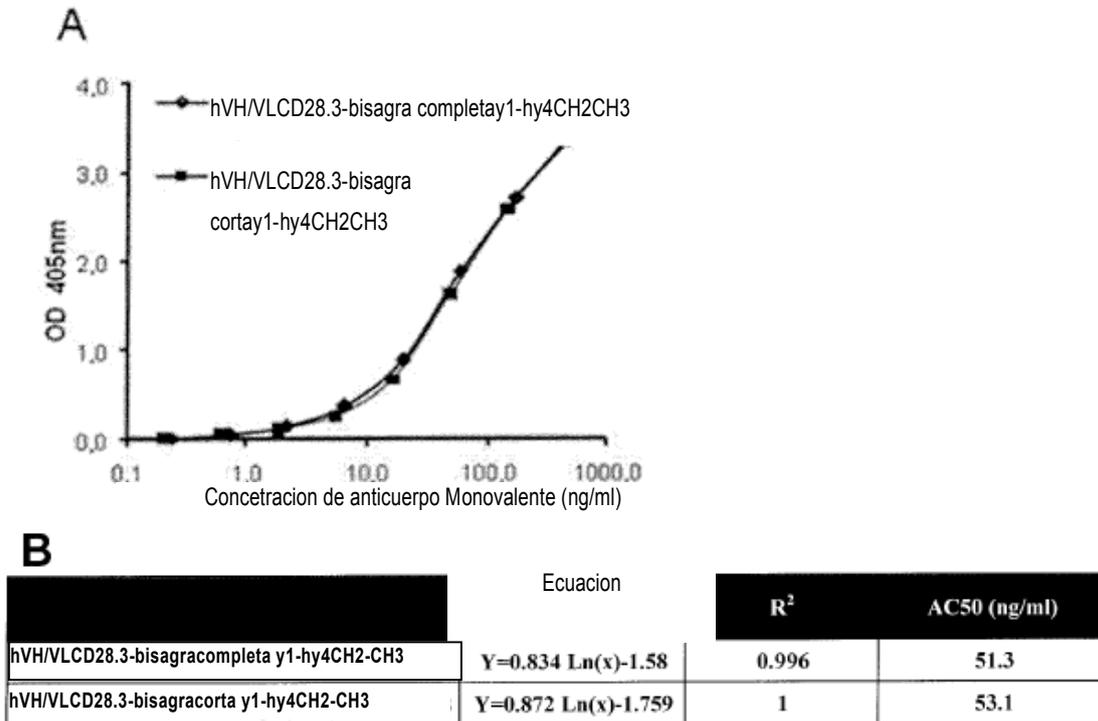


Figura 8

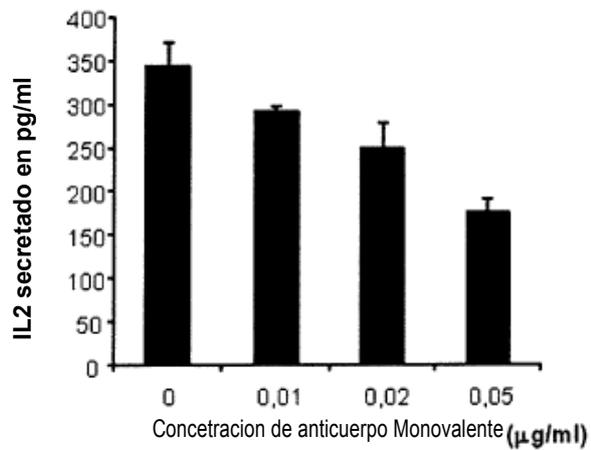


Figura 9

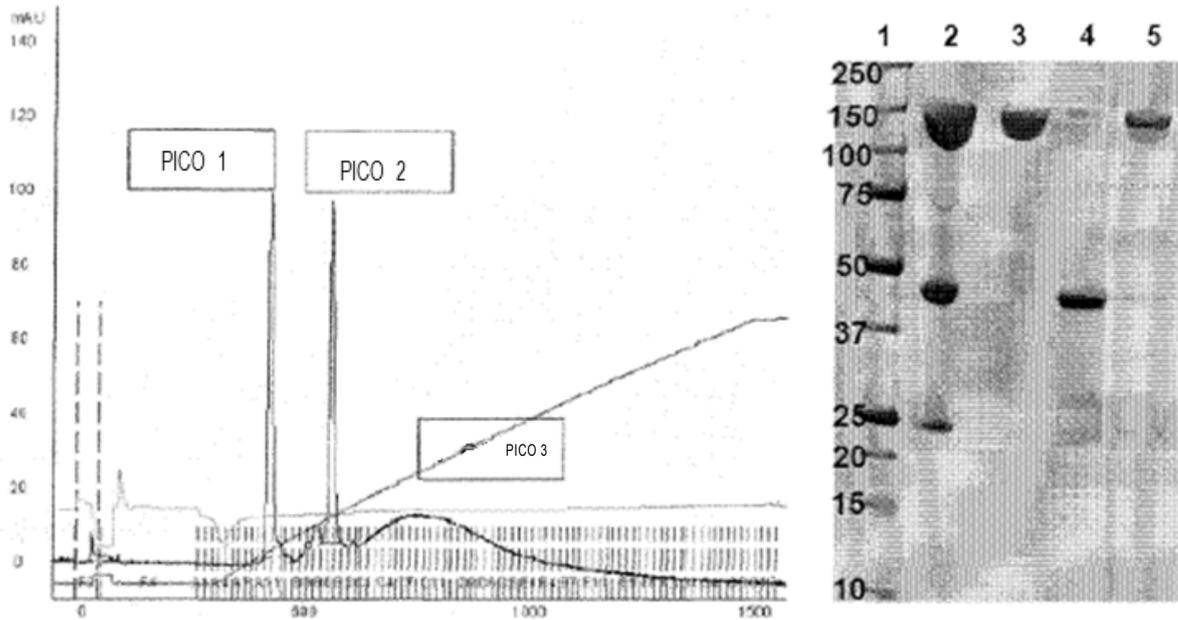


Figura 10

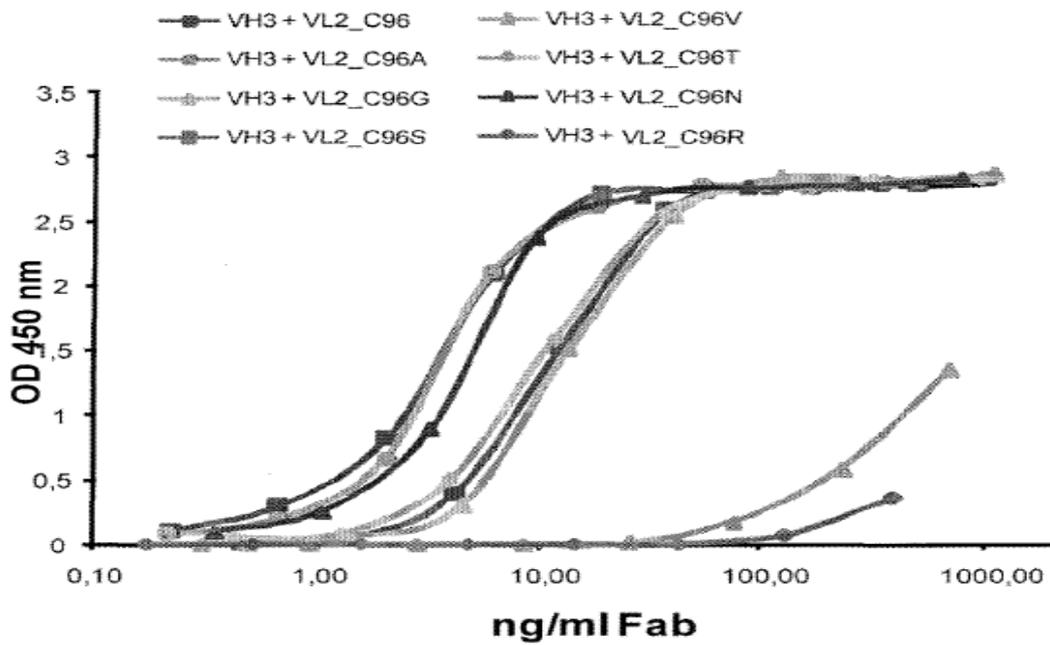


Figura 11

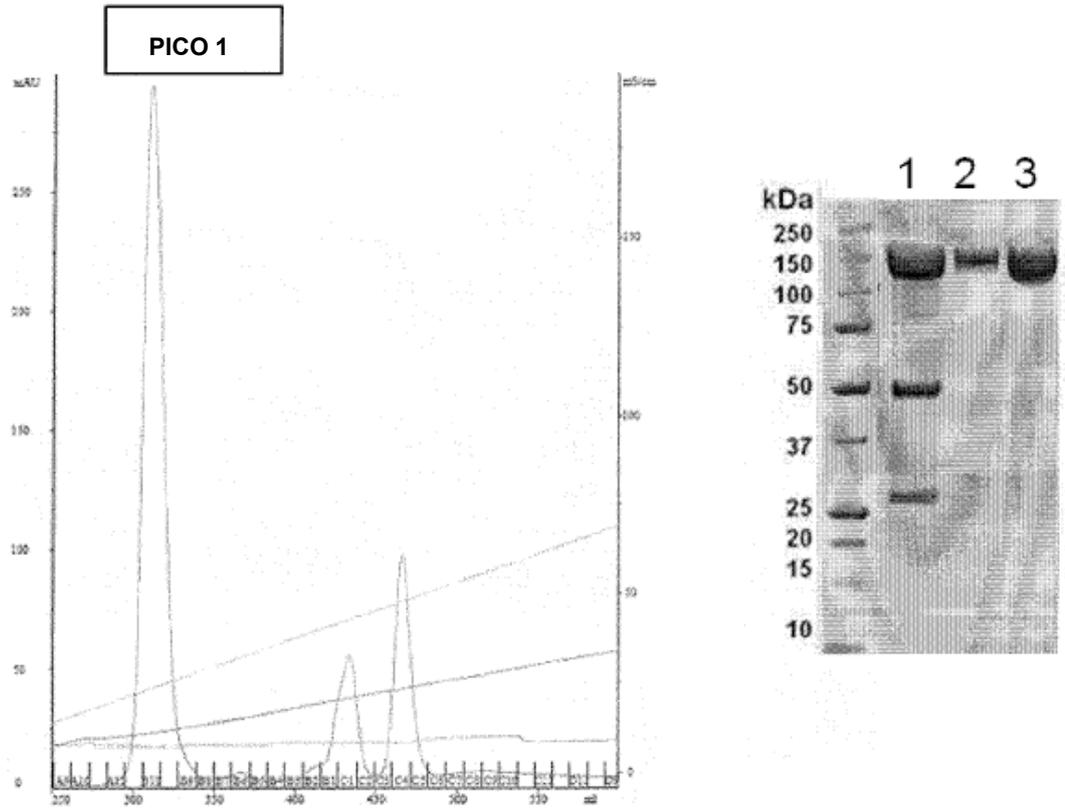


Figura 12

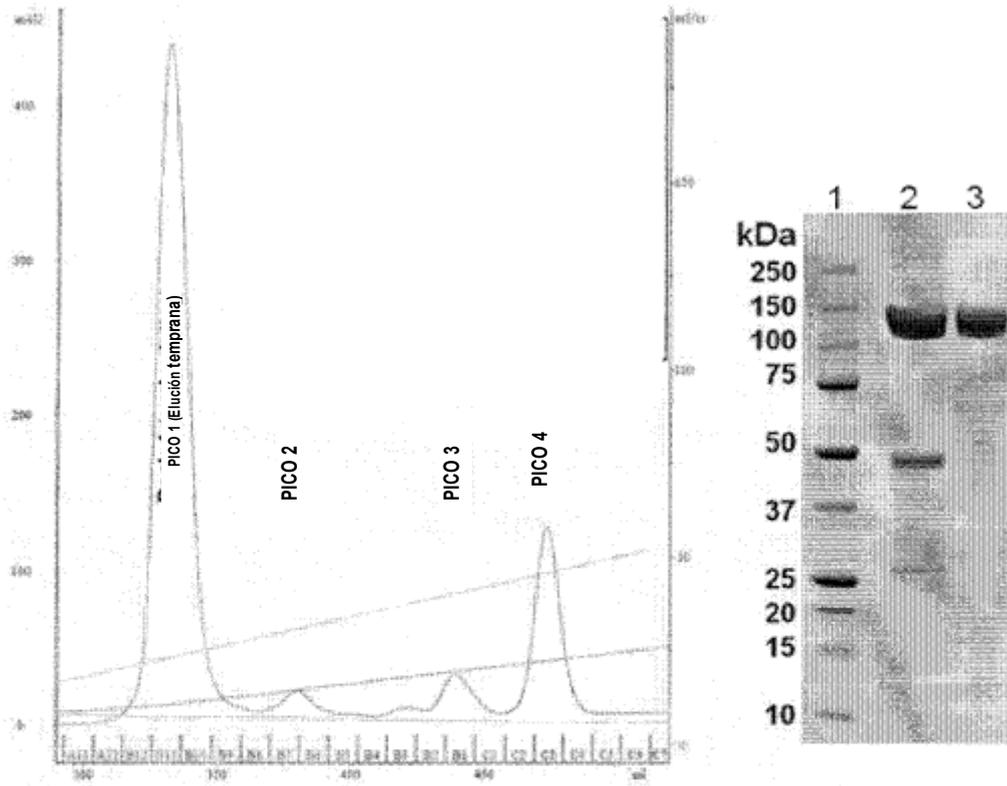


Figura 13