

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 173**

51 Int. Cl.:

C07K 16/34 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2009 PCT/IN2009/000741**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10079510**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2009 E 09827009 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2370469**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-RHD**

30 Prioridad:

31.12.2008 IN MU27302008

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

30.11.2018

73 Titular/es:

**BHARAT SERUMS AND VACCINES LTD. (100.0%)
16th and 17th Floor, Hoechst House, Nariman
Point
Mumbai 400 021, IN**

72 Inventor/es:

**DAFTARY, GAUTAM VINOD;
KAUNDINYA, JOHN y
CINEK, TOMAS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 692 173 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 monoclonales anti-RHD

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la producción y uso de anticuerpos monoclonales anti-Rhesus D y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Antecedentes y estado de la técnica

10 El antígeno Rhesus D (también denominado en la técnica antígeno RhD, factor Rhesus y/o factor Rh) es un antígeno que puede estar presente en la superficie de los glóbulos rojos humanos. Aquellos individuos cuyos glóbulos rojos tienen este antígeno generalmente se denominan "RhD positivos", mientras que aquellos individuos cuyos glóbulos rojos no tienen este antígeno se denominan "RhD negativos".

15 Una persona que es RhD negativa y nunca ha estado expuesta al antígeno RhD no producirá anticuerpos anti-RhD (anticuerpos contra el antígeno RhD). Sin embargo, la transferencia de sangre RhD positiva a un individuo RhD negativo conducirá a la sensibilización (inmunización) del individuo RhD negativo contra el antígeno RhD. Esto puede llevar a una serie de complicaciones. En particular, cuando una mujer RhD negativa da a luz a un bebé RhD positivo, existe el riesgo de que pequeñas cantidades de sangre del bebé entren en la circulación materna, lo que hace que la madre produzca anticuerpos anti-RhD. Si bien esto normalmente no dañará al primer bebé, si la madre ahora inmunizada queda embarazada de otro niño RhD positivo, entonces los anticuerpos maternos anti-RhD pueden cruzar la placenta y atacar las células sanguíneas del bebé, lo que lleva a una condición conocida como enfermedad hemolítica del recién nacido (HDN).

20 Por lo tanto, los anticuerpos anti-RhD se administran de forma rutinaria a pacientes RhD negativos cuando existe un riesgo de exposición a sangre RhD positiva, para evitar que el paciente se inmunice contra la sangre RhD positiva. Por ejemplo, a un paciente RhD negativo se le pueden administrar anticuerpos anti-RhD: antes y/o poco después de dar a luz o abortar a un bebé RhD positivo; después de cualquier incidente durante el embarazo que pueda haber provocado sangrado en la placenta; como medida preventiva de rutina durante el embarazo; o antes o después de cualquier transfusión de componentes sanguíneos que contengan glóbulos rojos RhD positivos.

25 Tradicionalmente, los anticuerpos anti-RhD utilizados han sido anticuerpos policlonales obtenidos del plasma sanguíneo de voluntarios RhD negativos que han sido inmunizados repetidamente contra los glóbulos rojos RhD positivos. Sin embargo, el uso de anticuerpos policlonales tiene varios inconvenientes reconocidos, entre los cuales se encuentran la necesidad continua de un número suficiente de donantes voluntarios que una cantidad que satisfaga la demanda de anticuerpos, y el riesgo de contaminación de la preparación de anticuerpos con cualquier virus u otros patógenos que pueden estar presentes en la sangre del donante.

30 Mientras que los anticuerpos policlonales constituyen anticuerpos secretados por varias células plasmáticas diferentes, y por lo tanto constituyen una mezcla de moléculas de inmunoglobulina secretadas contra un antígeno específico y potencialmente reconociendo una variedad de epítopos, los anticuerpos monoclonales se producen a partir de células que son todas clones de células progenitoras únicas, y por lo tanto constituyen una población homogénea de anticuerpos, como es bien conocido en la técnica. Las líneas celulares a partir de las cuales se producen los anticuerpos monoclonales se desarrollan y cultivan *in vitro*, y esto significa que los anticuerpos monoclonales tienen el potencial de producirse cuando sea necesario, tanto en grandes cantidades como con altos niveles de pureza. Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales anti-RhD tienen una serie de ventajas potenciales sobre las preparaciones de anticuerpos policlonales anti-RhD que se han usado tradicionalmente.

35 Se han descrito varias técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanos en general, y anticuerpos anti-RhD monoclonales humanos en particular. Por ejemplo, el documento EP-A2-0251440 divulga un anticuerpo monoclonal anti-RhD que produce un heterohibridoma formado por fusión de células de mieloma de ratón que no secretan Ig con una población que produce Ig anti-RhD de linfocitos humanos transformados con el virus de Epstein Barr (EBV).

40 El documento US 5.665.356 describe la producción de anticuerpos anti-RhD monoclonales humanos que tienen ciertas características definidas, producidas mediante el cultivo de linfocitos B humanos transformados con EBV seleccionados.

45 Los documentos US 6.312.690 y WO-A1-96/07740 describen la producción de anticuerpos monoclonales anti-RhD mediante técnicas recombinantes. Se seleccionó una línea celular humana inmortalizada con EBV que produce un anticuerpo monoclonal anti-Rhesus D llamado D7C2. Las secuencias que codifican las regiones variables de las cadenas pesada (H) y ligera (L) de D7C2 se clonaron, secuenciaron e insertaron en un vector de expresión de baculovirus recombinante bajo el control de un promotor de baculovirus fuerte. Se cultivaron células de insecto transfectadas con el baculovirus recombinante y se recuperó el anticuerpo monoclonal recombinante D7C2 del sobrenadante celular. El anticuerpo monoclonal D7C2 recombinante demostró en una prueba de ADCC una lisis específica más alta de glóbulos rojos RHD positivos que una preparación policlonal de referencia anti-RhD.

Beliard et al (R. Beliard et al, British Journal of Hematology, vol. 141, n. 1, abril de 2008, páginas 109-119) y Sibérial et al (S. Sibérial et al, Clinical Immunology, vol. 118, no.2-3, 1 de febrero de 2006, páginas 170-179) describen un anticuerpo monoclonal anti-RhD, que se conoce como R297 en Beliard et al y como T125 (YB2/0) en Sibérial et al. Este anticuerpo fue seleccionado para su posterior desarrollo por los autores de estos documentos debido a su respuesta inusualmente fuerte de ADCC contra las células sanguíneas RhD positivas que se encontró igual a las que producían los anticuerpos policlonales anti-RhD.

Kumpel (B. Kumpel, Transfusion Clinique et Biologique, vol. 4, no. 4, julio de 1997, páginas 351-356) describe dos anticuerpos monoclonales anti-RhD, denominados BRAD-3 y BRAD-5, que demostraron tener una buena actividad funcional y, sobre esta base, se seleccionaron para los ensayos clínicos de fase I. Se enseña que, en un ensayo de ADCC, se encontró que BRAD-3 es más potente que el RhD policlonal y se encontró que BRAD-5 es menos potente que el anti-RhD policlonal; y que, en otro ensayo de ADCC, se encontró que tanto BRAD-3 como BRAD-5 son menos potentes que los anti-RhD policlonales.

Brossard y otros (Transfusion Clinique et Biologique, vol. 3, no. 6, 1 de enero de 1996, páginas 459-463) describen los resultados de un estudio de ADCC de 54 anticuerpos anti-RhD monoclonales. Cada uno de los anticuerpos se probó en tres tipos diferentes de ensayo ADCC (ADCC-Ly, ADCC-Macro y ADCC-Mono), y los resultados de estos ensayos se compararon con los resultados obtenidos utilizando anti-RhD policlonal. De los 54 anticuerpos monoclonales anti-RhD probados, 47 fueron activos en al menos uno de los ensayos de ADCC, pero solo 6 fueron al menos tan activos como la preparación policlonal en al menos un ensayo, y solo 1 fue al menos tan activo como la preparación policlonal en los tres ensayos.

El documento US-A1-2003/0175969 describe un método para preparar anticuerpos monoclonales anti-RhD capaces de activar células efectoras que expresan FcγRIII, que comprende: a) purificación de anticuerpos monoclonales obtenidos de líneas celulares seleccionadas de heterohibridomas de linfocitos B humanos o líneas celulares humanas o animales recombinantes (tales como células CHO-K, CHO-Lec10, CHO Lec-1, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, HEK293, YB2/0, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 y P3X63Ag8.653); b) agregar cada anticuerpo obtenido en la etapa a) a una mezcla de reacción diferente que comprende glóbulos rojos RhD positivos, células efectoras que comprenden células que expresan FcγRIII, IgG polivalentes; y c) determinar el porcentaje de lisis de las células objetivo y seleccionar los anticuerpos monoclonales que activan las células efectoras que causan una lisis significativa de los glóbulos rojos RhD positivos.

El documento US 6.475.787 divulga un método para preparar anticuerpos monoclonales, en el que una célula huésped eucariótica adecuada se transforma con una secuencia de ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo y una secuencia de ADN que codifica una cadena ligera de anticuerpo, estando unidas las dos secuencias a diferentes genes marcadores amplificables para permitir la amplificación diferencial de los ADN de las cadenas pesada y ligera con el fin de optimizar los números relativos de copias de los genes de los ADN de las cadenas pesada y ligera. En una realización preferida, la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO) que es deficiente en DHFR (es decir, incapaz de producir dihidrofolato reductasa), uno de los genes marcadores amplificables es un gen de adenosina desaminasa (ADA), y el otro es un gen de DHFR. La amplificación del ADN que codifica una cadena de anticuerpo y se une en el gen ADA puede lograrse mediante el tratamiento de las células recombinantes con concentraciones crecientes de 2'-desoxicoformicina, mientras que se logra la amplificación del ADN que codifica la otra cadena de anticuerpo y está unida en el gen de DHFR, tratando la célula con concentraciones crecientes de metotrexato (MTX).

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de anticuerpos monoclonales anti-RhD adicionales y métodos para la producción de los mismos.

Descripción de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-RhD aislado que comprende:

una región variable de cadena pesada que es al menos un 80% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 2 y tiene una primera, segunda y tercera CDR (regiones determinantes de la complementariedad) que son idénticas a las respectivas primera, segunda y tercera CDR de la SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera que es al menos 80% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 4 y tiene una primera, segunda y tercera CDR que son idénticas a las primera, segunda y tercera CDR respectivas de la SEQ ID NO: 4, en donde las CDR del anticuerpo monoclonal son determinadas usando la herramienta IMGTV-QUEST.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-RhD" se refiere tanto a anticuerpos completos como a fragmentos de los mismos que tienen especificidad de unión por el antígeno RhD. La afinidad/especificidad de unión de un anticuerpo puede medirse mediante diversos ensayos, como se sabrá y puede ser implementado rutinariamente por un experto en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos que reconocen y se unen específicamente al antígeno RhD se pueden determinar usando una o más técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica, tales como, entre otras, las siguientes: técnicas EIA/ELISA, como EIA competitivo (inmunoensayo ligado a

enzimas); citometría de flujo; y/o ensayos de ADCC (toxicidad celular dependiente de anticuerpos). Ejemplos de EIA competitivos, citometría de flujo y técnicas de ADCC se describen con más detalle en los siguientes ejemplos.

5 Como es bien sabido en la técnica, los anticuerpos completos están formados típicamente por una o dos cadenas pesadas y una o dos ligeras. Las cadenas pesada y ligera comprenden cada una una región variable y una región constante. Las regiones variables (también denominadas dominios variables) dictan la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo. Cada dominio variable está compuesto por regiones determinantes de complementariedad (CDR, de las cuales normalmente hay tres, designadas CDR1, CDR2 y CDR3) intercaladas con regiones más conservadas conocidas como regiones marco. Al plegar el anticuerpo para adoptar la estructura cuaternaria correcta, las CDR de una cadena pesada y ligera forman juntas el sitio de unión al antígeno. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres o más dominios constantes y depende de la clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) e isotipo (por ejemplo, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) del anticuerpo. Es idéntico en todos los anticuerpos de la misma clase e isotipo, pero difiere en los anticuerpos de diferentes isotipos. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un único dominio constante del cual es uno de dos isotipos, kappa o lambda, y es igualmente idéntico en todos los anticuerpos del mismo isotipo. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente median la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del huésped.

10 Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención incluyen típicamente al menos las CDR y suficientes regiones marco para unirse específicamente al antígeno. Los ejemplos de tipos de fragmento incluyen, pero no se limitan a, un fragmento Fab' (que consiste en el dominio variable y un dominio constante de las cadenas ligera y pesada), un fragmento F(ab')₂ (dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región bisagra), un fragmento Fv (que consiste en los dominios variables solo de las cadenas ligera y pesada), y otros tipos de fragmentos conocidos por los expertos en la técnica.

Las SEQ ID NO: 2 y 4 son las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal anti-RhD denominado aquí como RhD1 y se describe a continuación con más detalle.

25 Los anticuerpos de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención comprenden, por lo tanto, regiones variables de cadena pesada y cadena ligera que tienen una primera, segunda y tercera regiones determinantes de complementariedad (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) que son idénticas o sustancialmente idénticas a la primera, segunda y tercera regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo RhD1.

30 Como se usa en el presente documento, el término "un anticuerpo monoclonal aislado" se refiere a un anticuerpo que se ha producido mediante técnicas monoclonales y que se ha aislado de anticuerpos de otros tipos. En otras palabras, los únicos otros anticuerpos presentes serán los anticuerpos producidos por células de la misma línea celular (es decir, todas las células se originan de la misma célula parental única) que la célula que produjo el anticuerpo monoclonal. Por supuesto, esto contrasta con, por ejemplo, los anticuerpos policlonales en los que los anticuerpos constituyen una mezcla de diferentes anticuerpos originados de diferentes células plasmáticas.

35 En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal anti-RhD aislado comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que son al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente 100% idénticas a las regiones variables respectivas de las cadenas pesada y ligera del RhD1. Por lo tanto, en esta realización, el anticuerpo comprende:

40 una región variable de cadena pesada que es al menos 90%, 95%, 98% o 100% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 2 y tiene una primera, segunda y tercera CDR que son idénticas a la respectiva primera, segunda y tercera CDR de la SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera que es al menos 90%, 95%, 98% o 100% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 4 y tiene una primera, segunda y tercera CDR que son idénticas a las respectivas primera, segunda y tercera CDR de la SEQ ID NO: 4.

45 Las técnicas para identificar regiones variables de anticuerpos y CDR, comparar y alinear secuencias de aminoácidos, y determinar el % de identidad entre dos secuencias de aminoácidos son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las CDR, las regiones variables y las regiones constantes de un anticuerpo se pueden determinar usando un software tal como la herramienta IMGT/V-QUEST (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/) usando la configuración predeterminada, y/o mediante la comparación con bases de datos de secuencias de inmunoglobulina conocidas, tales como IMGT/GENE-DB (http://imgt.cines.fr/IMGT_GENE-DB/GENElect?livret=0) o V-BASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). Las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, ya sea para anticuerpos completos o partes específicas de los mismos, pueden alinearse y su % de identidad puede determinarse utilizando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>), ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) o GAP (<http://genome.cs.mtu.edu/align/align.html>) usando parámetros predeterminados, o usando software patentado tal como Vector NTI v. 10.3.

55 En una realización preferida, el anticuerpo comprende además un dominio constante de cadena ligera y al menos un dominio constante de cadena pesada. El dominio constante de la cadena ligera puede ser de tipo kappa o lambda. El dominio constante de cadena pesada es preferiblemente un dominio constante de clase IgG. Por lo tanto, en esta realización, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab' o F(ab')₂, como se discutió anteriormente, o puede ser un anticuerpo completo. Si es el último, preferiblemente todos los dominios constantes de cadena pesada

son dominios de IgG (es decir, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada de IgG). En una realización particularmente preferida, el dominio o región constante es un dominio o región constante de IgG 1 o IgG 3. Preferiblemente, todos los dominios constantes (tanto ligeros como pesados) son dominios constantes humanos.

5 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica la cadena ligera y pesada de un anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto.

Como se usa en el presente documento, el término un "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido que se ha aislado de un entorno celular (es decir, no está presente en una célula u organismo), y puede estar en forma purificada (es decir, sustancialmente libre de otros polinucleótidos, proteínas y componentes celulares) que forman parte de la composición que contiene otros polinucleótidos y/o compuestos. El término "que codifica una cadena ligera" se refiere no solo a secuencias que codifican cadenas ligeras completas, sino también a secuencias que codifican fragmentos de las mismas (tales como solo el dominio variable) donde el anticuerpo a expresar es un fragmento de anticuerpo como se describió anteriormente. De manera similar, el término "que codifica una cadena pesada" se refiere no solo a las secuencias que codifican cadenas pesadas completas, sino también a las secuencias que codifican fragmentos de las mismas (tales como solo el dominio variable o el dominio variable más uno o más, pero no todos los dominios constantes) donde el anticuerpo a expresar es un fragmento de anticuerpo como se describió anteriormente.

Los ejemplos de secuencias de ácido nucleico incluyen las secuencias de codificación relevantes de las SEQ ID NOs: 1 y 3, secuencias que son las secuencias de codificación para, respectivamente, las SEQ ID NOs: 2 y 4 de aminoácidos. Por lo tanto, por ejemplo, si el anticuerpo comprende regiones variables idénticas a las regiones variables de las SEQ ID NOs: 2 y 4 (las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-RhD designado RhD1), entonces un ejemplo de secuencia de ácido nucleico podría comprender las secciones de las SEQ ID NOs: 1 y 3 que codifican dichas regiones variables. Alternativamente, tales secuencias de ácido nucleico podrían modificarse para una expresión optimizada (es decir, transcripción y/o traducción) en la célula huésped deseada, por ejemplo, a través de técnicas conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, la optimización de la secuencia de ácido nucleico nativa puede comprender uno o más de: optimización de la distribución de GC y estiramientos de AT/GC (para mejorar la estabilidad del ARNm); eliminación de motivos inhibidores (tales como señales poliA prematuras); eliminación de sitios de empalme crípticos (para evitar un empalme alternativo e incorrecto del ARNm); optimización de la estructura secundaria del ARNm (para evitar que las horquillas apretadas posiblemente detengan la traducción); optimización de los marcos de lectura abiertos (para evitar marcos de lectura secundarios o alternativos); y optimización del uso de codones (para evitar codones raros que pueden hacer más lenta la traducción).

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de expresión que comprende uno o más vectores de expresión y que incluye secuencias codificantes que codifican las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto.

35 El vector o los vectores de expresión pueden ser de cualquier tipo usado en la técnica, tal como por ejemplo plásmidos y vectores virales. Los vectores de expresión de la presente invención son preferiblemente plásmidos. Además de las secuencias codificantes de la cadena de anticuerpos, el vector o los vectores incluirán las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción adecuadas de las secuencias codificantes en la célula huésped deseada, tal como por ejemplo un promotor adecuado y una secuencia de poliadenilación (poliA). El vector o los vectores pueden comprender además una secuencia Kozak para aumentar la eficacia de la expresión y/o una secuencia que codifique un péptido señal para el transporte posterior a la traducción de las cadenas de anticuerpos (por ejemplo, para la secreción de los anticuerpos). Otra característica preferida es la presencia de uno o más genes de resistencia a antibióticos y/u otras formas de marcadores de selección, que permiten la selección de células que se han transfectado de manera estable con el vector, y/o que muestran una expresión más fuerte de las secuencias codificantes del anticuerpo, como se discute más adelante en forma detallada.

Las secuencias de los promotores y de poli(A) usadas para dirigir la expresión de las secuencias codificantes de cadena ligera y pesada pueden ser de cualquier tipo utilizado en la técnica. Se conoce una variedad de secuencias de diferentes promotores y poli(A), la selección de secuencias apropiadas y promotores de poli(A) para uso en la célula huésped elegida está dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Por ejemplo, los promotores adecuados para uso en una célula huésped de mamífero incluyen los promotores de SV40 temprano, tardío, del factor 1 de alargamiento (EF-1) y de citomegalovirus (CMV). Las secuencias de poli(A) adecuadas incluyen aquellas de poli(A) de SV40, de la hormona de crecimiento bovina (BGH), de timidina quinasa (TK) y de la hormona de crecimiento humana (hGH). En una realización preferida, las secuencias codificantes de cadena ligera y pesada están dirigidas por el promotor del factor 1 alfa humano de alargamiento (hEF-1 α) y la secuencia de poli(A) de BGH.

55 En una realización, el sistema de expresión comprende un vector de expresión que incluye tanto la secuencia de codificación para la cadena ligera como la secuencia de codificación para la cadena pesada.

En una realización alternativa, las secuencias de codificación de cadena ligera y pesada se transportan mediante vectores separados, comprendiendo el sistema de expresión:

un primer vector de expresión que incluye la secuencia de codificación que codifica la cadena ligera; y

un segundo vector de expresión que incluye la secuencia de codificación que codifica la cadena pesada.

En esta realización, uno o ambos de dichos primer y segundo vectores de expresión pueden incluir un marcador de selección de dihidrofolato reductasa (*dhfr*). Este marcador comprende una secuencia de codificación para DHFR, que está acoplada a secuencias adecuadas de un promotor y de poliadenilación, preferiblemente las secuencias del promotor SV40 temprano (SV40E) y de poli(A). DHFR permite la síntesis nueva de la timidina precursora de ADN. Por lo tanto, al transfectar una línea celular huésped que es deficiente en DHFR (es decir, que por sí misma es incapaz de producir DHFR), se pueden seleccionar las células que han integrado de forma estable el vector en su genoma haciendo crecer las células en un medio deficiente en desoxirribonucleósidos y ribonucleósidos. Además, una vez que se han aislado las células transfectadas con éxito, la expresión de la secuencia o secuencias de codificación deseadas (es decir, la cadena ligera y/o pesada) se pueden amplificar utilizando el metotrexato (MTX) inhibidor de DHFR, lo que hace que algunas células reaccionen amplificando grandes regiones de ADN que rodean al gen *dhfr*.

En una realización preferida, uno de dichos primer y segundo vectores de expresión incluye un gen de resistencia a antibióticos (una secuencia de ácido nucleico que imparte resistencia al antibiótico en cuestión) pero no incluye la secuencia de codificación de DHFR, y el otro de dichos vectores de expresión incluye la secuencia de codificación de DHFR pero no incluye un gen que proporcione resistencia al mismo antibiótico que dicho gen de resistencia a antibióticos. El gen de resistencia a antibióticos puede ser de cualquier tipo usado en la técnica. Por ejemplo, los genes de resistencia a antibióticos adecuados para impartir resistencia a una célula huésped de mamífero incluyen: genes de resistencia a aminoglucósidos (por ejemplo, neomicina, higromicina B), tales como neomicina fosfotransferasa (*npt*) e higromicina B fosfotransferasa (*hpt*, *hph*); genes de resistencia aminonucleósidos (por ejemplo, puromicina) tales como puromicina N-acetiltransferasa (*pac*); genes de resistencia a glicopéptidos (por ejemplo, bleomicina, fleomicina) tales como el gen *ble*; y genes de resistencia a peptidil nucleósidos (por ejemplo, blasticidina), tales como los genes *bls*, *bsr* o *bsd*. Al igual que con el marcador de selección de *dhfr*, el gen de resistencia a antibióticos puede acoplarse, según sea necesario, a cualquiera de las secuencias adecuadas del promotor y de poliadenilación. Se prefieren las secuencias del promotor de SV40 temprano (SV40E) y de poli(A).

En una realización particularmente preferida, el gen de resistencia a antibióticos comprende una secuencia que codifica neomicina fosfotransferasa (NPT). Las células transfectadas de manera estable con el vector que incluye la secuencia codificadora de NPT pueden seleccionarse cultivando las células en un medio que contenga neomicina o un análogo de neomicina tal como G418, cuyos efectos tóxicos se neutralizan mediante NPT.

Por lo tanto, la realización descrita anteriormente, en la que un vector tiene el marcador de selección de *dhfr* y el otro tiene el gen de selección de antibióticos, permite la selección de solo aquellas células que tienen ambos vectores integrados de manera estable en su genoma haciendo crecer las células en un medio deficiente en desoxirribonucleósidos y ribonucleósidos y que contiene el antibiótico relevante (como la neomicina o un análogo adecuado donde el gen de resistencia a los antibióticos es el gen *npt*). Las células que no fueron transfectadas o fueron transfectadas con un solo plásmido no sobrevivirán al proceso de selección. Además, debido a que los plásmidos cotransfectados a menudo se integran en un punto del genoma, el crecimiento subsiguiente de las células transfectadas con éxito en concentraciones crecientes de MTX todavía se puede usar para amplificar de manera efectiva la expresión de las cadenas de anticuerpos codificadas por ambos vectores (es decir, para amplificar la expresión de ambas secuencias de cadena pesada y ligera).

Debe observarse que, si bien, en esta realización, el vector que porta el marcador de selección de *dhfr* no incluye el gen que proporciona resistencia al mismo antibiótico que el gen de resistencia a los antibióticos transportado por el otro vector, este y ambos vectores pueden comprender además un gen diferente de resistencia a los antibióticos que proporciona resistencia contra un antibiótico adicional. De nuevo, el gen antibiótico adicional puede ser de cualquier tipo usado en la técnica. Por ejemplo, cuando uno, pero no ambos vectores, portan una secuencia codificadora de NPT (que proporciona resistencia contra la neomicina y sus análogos), ambos vectores también pueden incluir un gen de resistencia a la ampicilina (AmpR), con el fin de proporcionar resistencia a la ampicilina cuando se incorporan en una célula huésped bacteriana. Otros genes de resistencia a antibióticos que se usan comúnmente para impartir resistencia en huéspedes bacterianos incluyen: genes de β -lactamasa (que proporcionan resistencia a los antibióticos de β -lactama, como la ampicilina y otras penicilinas), tales como la β -lactamasa TEM-1; genes que proporcionan resistencia a los aminoglucósidos tales como estreptomina, kanamicina, tobramicina y amikacina; y genes de resistencia a tetraciclina (por ejemplo, tetraciclina, doxiciclina, minociclina, oxtetraciclina), tales como los genes *tetA*.

De acuerdo con un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una célula transformada con un sistema de expresión de acuerdo con el tercer aspecto o cuarto aspecto.

Las células huésped para uso en la presente invención pueden ser de cualquier tipo adecuado. Sin embargo, en una realización preferida, la célula huésped (célula a transfectar) es una célula eucariota, más preferiblemente una célula de vertebrado, más preferiblemente una célula de mamífero. Se dispone de una variedad de células huésped de mamíferos adecuadas, tales como, por ejemplo, las enumeradas en el documento USA1-2003/0175969 referido

anteriormente. Las células huésped de mamífero preferidas incluyen: todas las variantes de células CHO, tales como CHO K1 y CHO deficiente en *dhfr* (DG44, DXB11); HEK293; BHK; COS-1 y COS-7; NSO; y PER.C6. Las células huésped preferidas son células de ovario de hámster chino (CHO), en particular células CHO deficientes en *dhfr* (células CHO *dhfr*-). Las células huésped pueden transfectarse con los vectores de expresión usando técnicas estándar y condiciones de transfección, tales como las que se conocen en la técnica. Las condiciones de transfección a modo de ejemplo se proporcionan en los ejemplos más adelante.

De acuerdo con un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para fabricar anticuerpos monoclonales, que comprende cultivar células recombinantes según el cuarto aspecto y recuperar el anticuerpo monoclonal del medio de cultivo. Los medios de cultivo y condiciones a modo de ejemplo se proporcionan en los Ejemplos que siguen, pero se pueden usar cualesquiera condiciones de cultivo adecuadas y medios de cultivo comerciales o personalizados, como se emplean habitualmente en la técnica. Del mismo modo, se puede emplear cualquier técnica estándar para purificar anticuerpos secretados de medios de cultivo, siendo los ejemplos de las técnicas como se describen a continuación.

De acuerdo con un sexto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el primer aspecto. Preferiblemente, la composición farmacéutica también comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los anticuerpos monoclonales pueden formularse según se desee, dependiendo de la vía de administración prevista. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden formularse para inyección (por ejemplo, intramuscular) de manera análoga a las formulaciones policlonales convencionales anti-D. Los ejemplos de dosis varían de 150 a 300 microgramos (medido por el título de aglutinación, como se describe a continuación con más detalle). Los ejemplos de vehículos incluyen: solución salina amortiguada de fosfato; y regulador salino de glicina.

La composición puede comprender anticuerpos monoclonales solamente de un tipo único (es decir, los únicos anticuerpos presentes en la composición son anticuerpos producidos por células de la misma línea celular). Alternativamente, la composición puede comprender una combinación de más de un tipo de anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, la composición podría comprender dos o más tipos distintos de anticuerpos monoclonales que están de acuerdo con el primer aspecto de la invención, tal como una combinación de dos o los tres anticuerpos monoclonales RhD1, RhD2 y/o RhD3. Alternativa o adicionalmente, la composición podría comprender, además de los anticuerpos monoclonales de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, otros anticuerpos monoclonales anti-RhD por ejemplo, como se conocen en la técnica. En una realización preferida, la composición comprende al menos un anticuerpo monoclonal que tiene un dominio o región constante de IgG1, y al menos un anticuerpo monoclonal que tiene un dominio o región constante de IgG3.

Cuando la composición comprende una combinación de más de un tipo de anticuerpo monoclonal, se prefiere que la composición comprenda no más de 50 tipos diferentes de anticuerpo monoclonal. Más preferiblemente, la composición comprende a lo sumo 25, 20, 15, 10 o 5 tipos diferentes.

Según un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el primer aspecto, o una composición farmacéutica de acuerdo con el sexto aspecto, para uso en un método para inhibir o prevenir la inmunización de un paciente humano RhD negativo contra sangre RhD positiva.

Las indicaciones y/o circunstancias específicas en las que se pueden usar los anticuerpos monoclonales corresponden a aquellos para los que se usan los anticuerpos policlonales anti-RhD existentes.

De acuerdo con un octavo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el primer aspecto en la fabricación de un medicamento para inhibir o prevenir la inmunización de un paciente humano RhD negativo contra sangre RhD positiva.

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitativos, con referencia también a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 es una alineación de secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales RhD1, RhD2 y RhD3, en las que las regiones variables se han subrayado y las regiones determinantes de la complementariedad se resaltan en negrita y sombreadas;

La Figura 2 es una alineación de secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras de los anticuerpos monoclonales RhD1, RhD2 y RhD3, en las que las regiones variables se han subrayado y las regiones determinantes de la complementariedad se resaltan en negrita;

La Figura 3 es un mapa del vector plásmido pCB3;

La Figura 4 es un mapa del vector plásmido pCB11;

La Figura 5 es un mapa de pCB3 que contiene una secuencia codificante de cadena pesada del anticuerpo anti-RhD (HC de RhD); y

La Figura 6 es un mapa de pCB11 que contiene una secuencia codificante de cadena ligera del anticuerpo anti-RhD (LC de RhD);

La Figura 7 es un ejemplo de una curva de dosis - respuesta generada en un ensayo de ADCC, en el que se grafica la citotoxicidad contra el logaritmo de la concentración de anticuerpos a la que se presensibilizaron los eritrocitos; y

5 La Figura 8 es un ejemplo de regresión lineal realizada en los puntos de datos relevantes tomados de la Fig. 7.

Los listados de secuencias que son 48 en número se proporcionan después de los Dibujos.

Los listados de secuencias también se proporcionan por separado en el CD acompañante en forma electrónica.

Ejemplos

10 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células B de sangre periférica de voluntarios sanos hiperinmunizados con glóbulos rojos Rhesus D (RhD) positivos

15 La sangre de voluntarios sanos RhD negativos inmunizados repetidamente con glóbulos rojos aislados de individuos sanos RhD positivos del mismo grupo sanguíneo ABO se obtuvo de Cliniqua. Cuatro semanas después de la última inmunización, se comprobó el título de anti-RhD en suero, se tomaron muestras de sangre a los voluntarios, se separaron sus células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de otras poblaciones de células sanguíneas mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia), y las células fueron usadas frescas o crioconservadas para uso posterior. Las células T se agotaron de forma rutinaria mediante la formación de rosetas con globulos rojos de oveja tratados con bromhidrato de bromuro de S-(2-aminoetil)isotiouronio (AET) al 2% y las células B enriquecidas resultantes fueron se transformaron mediante el virus de Epstein-Barr (EBV).

Transformación de EBV

20 Dado que se ha demostrado que la activación de EBV es ventajosa para la fusión posterior de células B humanas con la pareja de fusión respectiva, las células B enriquecidas se transformaron mediante EBV utilizando un sobrenadante agotado de la línea celular de tití B95-8 como fuente del virus. Las células B resuspendidas en un medio completo IMDM (Gibco) con 30% de suero de ternera fetal (FCS) se sembraron en placas de 96 pozos a una concentración entre 5×10^3 y $2,5 \times 10^4$ células/pozo. El sobrenadante de B95-8 se añadió a los pozos en una cantidad que oscila entre el 5% y el 40% del volumen total. Las placas se incubaron en una incubadora de CO₂ al 5% humidificada a 37°C durante dos a cuatro semanas antes del cribado.

25 Cribado de placas para transformantes que secretan anticuerpos anti-RhD

30 Se cribaron los sobrenadantes de células B transformadas para determinar la presencia de anticuerpos anti-RhD mediante inmunoensayo unido a enzima competitiva (EIA). El principio de la prueba es el siguiente: un anticuerpo de referencia anti-RhD monoclonal marcado de afinidad y especificidad de unión conocida (Brad-5; NIBSC) compite con un anticuerpo no marcado (en este caso, los anticuerpos secretados en los sobrenadantes) para unirse a eritrocitos RhD positivos. Una inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal de referencia (mAb) indica la presencia de anticuerpos específicos de RhD que se unen al mismo epítipo inmunodominante que el mAb de referencia. El grado de inhibición de la unión del mAb de referencia se correlaciona con la concentración y la afinidad de los anticuerpos interferentes.

35 Los eritrocitos RhD positivos (haplotipo R2R2; ImmucorGamma) tratados con papaína se fijaron con glutaraldehído y se inmovilizaron en el fondo de placas de prueba de fondo plano de 96 pozos. Después de un lavado y bloqueo extensivo de las placas, los sobrenadantes de las células B transformadas, los estándares y los controles negativos se agregaron a los pozos y las placas se incubaron durante 30-60 minutos a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron tres veces. Se añadió el mAb de referencia biotinilado y las placas se incubaron durante 30 minutos más a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con un reactivo secundario, conjugado ExtrAvidin-Fosfatasa Alcalina (Sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de otra etapa de lavado, se añadió el sustrato Sigma Fast PNPP (fosfato de p-nitrofenilo) (Sigma). Cuando el color se desarrolló lo suficiente, la reacción se detuvo con NaOH 3N y la unión del mAb de referencia se detectó leyendo las densidades ópticas (a 405 nm) en un lector de placas (Bio-Rad). Los datos se analizaron con un paquete de software suministrado con el lector de placas.

Fusión celular

40 Debido a que las células B humanas transformadas con EBV son inestables y pueden dejar de producir anticuerpos rápidamente, generalmente es necesaria la fusión con una pareja de fusión adecuada para prolongar su vida útil y permitir su subclonación. Por lo tanto, cualquier cultivo de células B transformadas que produjeron anticuerpos que inhiben la unión del anticuerpo de referencia biotinilado a los eritrocitos RhD⁺ de acuerdo a lo evaluado por EIA (véase más arriba) se fusionaron con un heterohibridoma humano K₆H₆/B5 ya sea por el método estándar de polietilenglicol (PEG) o por electrofusión. La electrofusión se realizó con el aparato de electrofusión (Eppendorf Multiporator) y un regulador de electrofusión (Eppendorf) de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Subclonación de hibridomas.

5 Se cultivaron subclones en capas alimentadoras establecidas a partir de la línea de fibroblastos de prepucio de recién nacido CCD-1114Sk (ATCC). Los alimentadores se mantuvieron en medios IMDM que contenían suero bovino fetal (FBS) al 2-20%, dependiendo del cultivo celular. Las bandejas alimentadoras se trataron con luz UV el día de la subclonación. Se contaron las líneas celulares a subclonar, se prepararon las diluciones apropiadas para la placa de aproximadamente 0,3 células/pozo y se pipetearon las suspensiones celulares en las placas de 96 pozos que contenían la capa alimentadora. Cada línea celular se sembró en al menos dos placas. Los cultivos fueron alimentados cada 3-4 días. Los sobrenadantes de los pozos que exhiben crecimiento de hibridomas se probaron mediante EIA generalmente en 3-4 semanas.

10 Clones de hibridoma seleccionados para el desarrollo de líneas de células recombinantes

Los clones de hibridoma seleccionados para el desarrollo de anticuerpos recombinantes se enumeran en la Tabla 1 (a continuación). A cada clon se le asignó una designación simplificada para el propósito del desarrollo de líneas celulares recombinantes.

Tabla 1. Designación de anticuerpos anti-RhD

Clon de hibridoma	Isotipo de anticuerpo	Designación del clon
SD30.06.F5.1 G2	IgG1 humana, lambda	RhD1
SD30.02.C3.3 D11	IgG1 humana, lambda	RhD2
SD412.04.G11.2D10	IgG3 humana, kappa	RhD3

15

Aislamiento de ARN

El ARN total de células de hibridoma se purificó usando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante con la etapa adicional de extracción de ARN con cloroformo para eliminar trazas de fenol. La cuantificación espectrofotométrica de ARN se llevó a cabo a 260 nm suponiendo que 1 OD era equivalente a 40 µg/mL de ARN.

20

Síntesis de la primera cadena

La primera cadena de ADNc se sintetizó utilizando el sistema de primera cadena Super Script III para RT-PCR (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo sugerido por el proveedor. El cebador Oligo d(T) del kit se utilizó en todos los casos para cebar las reacciones.

25 Hidrólisis de ARN

La eliminación de las moléculas de ARN de la reacción de transcripción inversa se llevó a cabo mediante digestión con RNasaH (sistema de primera cadena Super Script III para RT-PCR) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc de la primera cadena se clonó utilizando el kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen).

Cola del ADNc de la primera cadena

30 Para facilitar la amplificación del ADNc de la primera cadena con una secuencia 3' desconocida, se anexó una cola de poli(A) al extremo 3' de cada ADNc A para crear un sitio de cebado definido. Para este propósito, se utilizó la desoxinucleotidil transferasa terminal recombinante (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El producto de reacción se limpió utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen).

35 Amplificación por PCR de cadenas pesadas (HC) y ligeras (LC) de Ig

Los cebadores (SEQ ID NOs: 13 a 19) utilizados para amplificación por PCR de las secuencias que codifican las cadenas pesada y ligera del ADNc de la primera cadena se enumeran a continuación (la secuencia de restricción EcoRI en cada cebador está subrayada).

Cebador directo (compatible con la extensión poli(A) de la primera cadena de ADNc):

40 Para todas las cadenas:

5'-GACTGAATTC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Cebadores inversos (específicos del gen):

Para cadenas gamma:

5'-ACTG GAATTC GGTGCTTTATTTCCATGCTGG-3 '

5'-ACTG GAATTC GTACGTGCCAAGCATCCTCG-3 '

Para cadenas kappa:

5 5'-ACTG GAATTC AGAGGCCAAAGGATGGGAGG-3 '

5'-GACT GAATTC CTGGAAGTGGAGGAGCAGGTGG-3'

Para cadenas lambda:

5'-GACT GAATTC CCTGGGATCCTGCAGCTC-3'

5'-ACTG GAATTC GGGGTGAGGGTTGAGAACC-3'

10 La PCR se llevó a cabo utilizando ADN polimerasa termoestable PfuUltra High-Fidelity (Stratagene). Típicamente, los primeros cinco ciclos se cebaron solo con el cebador directo; la temperatura de hibridación fue de 45°C. Después de eso, se añadió el cebador inverso, específico del gen y la PCR se extendió por otros 30-35 ciclos a una temperatura de hibridación de 50-65°C. Los fragmentos resultantes se purificaron en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen), se subclonaron en el vector de clonación pBluescript y se secuenciaron.

15 Subclonación de productos de PCR en el vector de clonación pBluescript

Los productos de PCR purificados se ligaron usando el kit de ligación rápida (NEB) en el vector de clonación pBluescript (Stratagene) cortado con EcoRV. Las células bacterianas DH5α se transformaron con el ADN resultante y se diseminaron en placas LB suplementadas con 40 µg/mL de ampicilina y se trataron previamente con 50 µL de Xgal de 20 mg/mL y 25 µL de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) de 200 mg/mL. Las colonias se seleccionaron en azul/blanco por la presencia de un inserto.

Aislamiento de ADN plasmídico y secuenciación

Las colonias blancas seleccionadas se recogieron y se expandieron. El ADN se aisló con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Se realizó una digestión de control con EcoRI (los cebadores de PCR directa e inversa contenían un sitio EcoRI). Se secuenciaron inserciones en plásmidos que producen el patrón de digestión esperado (Biotech Core).

Codificación de RhD1, RhD2 y RhD3 y secuencias de aminoácidos

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de RhD1, RhD2 y RhD3, y las secuencias de nucleótidos correspondientes que codifican dichas cadenas pesada y ligera se exponen en la lista de secuencias adjunta, como se explica con más detalle a continuación.

30 Las secuencias se analizaron con la ayuda de bases de datos y software de IMGT (imgt.cines.fr). Más específicamente:

las secuencias de las regiones constantes se determinaron a partir de la base de datos IMGT/GENE-DB de secuencias genómicas de Ig (http://imgt.cines.fr/IMGT_GENE-DB/GENEselect?livret=0), seleccionando la especie, el locus y el tipo de gen, grupo (subgrupo omitido) y funcionalidad (por ejemplo, especie: Homo sapiens, locus: IGH, tipo de gen: constante, grupo: IGHC, funcionalidad: funcional) y buscando en la base de datos de la lista resultante, se seleccionó el isotipo deseado (por ejemplo, IGG1) con el fin de identificar la secuencia o secuencias de referencia apropiadas de IMGT/LIGM-DB para la comparación con la secuencia de RhD;

las regiones variables se determinaron restando las regiones constantes; y

40 las CDR se determinaron utilizando la herramienta IMGT/V-QUEST (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/), seleccionando la especie de inmunoglobulina (humana), cargando la secuencia de nucleótidos de la cadena de anticuerpos completa, o solo su región variable, en formato FASTA, y analizando la secuencia usando la configuración predeterminada de IMGT/V-QUEST.

Para obtener más información sobre la herramienta IMGT/V-QUEST e IMGT/GENE-DB, consulte también:

45 Lefranc M.-P., Giudicelli V., Kaas Q., Duprat E., Jabado-Michaloud J., Scaviner D., Ginestoux C., Clément O., Chaume D. y Lefranc G. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. Nucl. Acids Res., 2005, 33, D593-D597;

Giudicelli V., Chaume D. y Lefranc M.-P. IMGT/V-QUEST, an integrated software for immunoglobulin and T cell receptor V-J y V-D-J rearrangement analysis. Nucl. Acids Res. 2004, 32, W435-W440; y,

Giudicelli V., Chaume D. y Lefranc M.-P. IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. Nucl. Acids Res. 2005, 33, D256-D261.

V-BASE (una base de datos de todas las secuencias de región variable de línea germinal humana; <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) también se puede usar para determinar, o corroborar, los extremos de una región variable. Bajo las alineaciones, se pueden encontrar secuencias de línea germinal de los péptidos señal, segmentos V, segmentos D (si corresponde) y segmentos J de todas las cadenas pesada y ligera. Será evidente a partir del análisis de IMGT qué segmentos se emplean en una cadena dada de anticuerpos. Luego se puede referenciar luego el segmento J particular en V-BASE para determinar el extremo exacto.

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de la región codificante de HC de RhD1. Los nucleótidos 1-57 codifican el péptido señal. Los nucleótidos 58-448 codifican la región variable, de la cual los nucleótidos 133-156 codifican CDR1, los nucleótidos 208-231 codifican CDR2 y los nucleótidos 346-414 codifican CDR3. Los nucleótidos 449-1437 codifican la región constante (siendo esta una región constante gamma1 o IgG1). La secuencia de aminoácidos de HC de RhD1 se proporciona como SEQ ID NO: 2.

La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de la región codificante de LC de RhD1. Los nucleótidos 1-57 codifican el péptido señal. Los nucleótidos 58-388 codifican la región variable, de la que los nucleótidos 133-159 codifican CDR1, los nucleótidos 211-219 codifican CDR2 y los nucleótidos 328-357 codifican CDR3. Los nucleótidos 389-705 codifican la región constante (siendo esta una región constante lambda). La secuencia de aminoácidos de LC de RhD1 se proporciona como la SEQ ID NO: 4.

La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos de la región codificante de HC de RhD2. Los nucleótidos 1-57 codifican el péptido señal. Los nucleótidos 58-448 codifican la región variable, de los cuales los nucleótidos 133-156 codifican CDR1, los nucleótidos 208-231 codifican CDR2 y los nucleótidos 346-414 codifican CDR3. Los nucleótidos 449-1437 codifican la región constante (siendo esta una región constante gamma1 o IgG1). La secuencia de aminoácidos de HC de RhD2 se proporciona como la SEQ ID NO: 6.

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos de la región codificante de LC de RhD2. Los nucleótidos 1-57 codifican el péptido señal. Los nucleótidos 58-388 codifican la región variable, de los cuales los nucleótidos 133-159 codifican CDR1, los nucleótidos 211-219 codifican CDR2 y los nucleótidos 328-357 codifican CDR3. Los nucleótidos 389-705 codifican la región constante (siendo esta una región constante lambda). La secuencia de aminoácidos de LC de RhD2 se proporciona como la SEQ ID NO: 8.

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de nucleótidos de la región de codificación de HC de RhD3. Los nucleótidos 1-57 codifican el péptido señal. Los nucleótidos 58-448 codifican la región variable, de los cuales los nucleótidos 133-162 codifican CDR1, los nucleótidos 214-234 codifican CDR2 y los nucleótidos 349-414 codifican CDR3. Los nucleótidos 449-1578 codifican la región constante (siendo esta una región constante gamma3 o IgG3). La secuencia de aminoácidos de HC de RhD3 se proporciona como la SEQ ID NO: 10.

La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos de la región codificante de LC de RhD3. Los nucleótidos 1-66 codifican el péptido señal. Los nucleótidos 67-391 codifican la región variable, de los cuales los nucleótidos 145-162 codifican CDR1, los nucleótidos 214-222 codifican CDR2 y los nucleótidos 331-360 codifican CDR3. Los nucleótidos 392-711 codifican la región constante (siendo esta una región constante kappa). La secuencia de aminoácidos de LC de RhD3 se proporciona como la SEQ ID NO: 12.

Alineaciones de secuencias de aminoácidos de RhD1-RhD3

Las secuencias de aminoácidos de RhD1-RhD3 se alinearon con el programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/), utilizando los parámetros predeterminados del sitio web. Las alineaciones resultantes de HC y LC se representan en las Figuras 1 y 2, respectivamente. La región variable de cada secuencia se ha subrayado, y las CDR se han resaltado en negrita (la primera CDR que aparece, que lee las secuencias de izquierda a derecha y de arriba a abajo, es la CDR1, la segunda es la CDR2 y la tercera es la CDR3). Cuando aparece el mismo aminoácido en las tres cadenas alineadas, esto se identifica con un "*" debajo del aminoácido relevante en la secuencia inferior (la de RhD3).

De manera similar, GAP (<http://genome.cs.mtu.edu/align/align.html>) que usa parámetros predeterminados (coincidencia máxima = 11; coincidencia mínima = -4; penalización por hueco = 10; penalización por extensión del hueco = 2) se puede utilizar para alinear y determinar el porcentaje de identidad entre pares individuales de secuencias o secciones de las mismas. Cuando se comparan de esta manera, las regiones variables de cadena ligera de RhD1 y RhD2 son 94% idénticas (104 coincidencias, 6 faltas de coincidencia, 0 huecos, puntaje de similitud de 540), las regiones CDR1 son 88% idénticas (8 coincidencias, 1 falta de coincidencia, 0 huecos, puntaje de similitud de 43), las regiones CDR2 son 100% idénticas (3 coincidencias, 0 falta de coincidencia, 0 huecos, puntaje de similitud de 16), y las regiones CDR3 son 90% idénticas (9 coincidencias, 1 falta de coincidencia, 0 huecos, puntaje de similitud de 43). Las regiones variables de cadena pesada RhD1 y RhD2 son 94% idénticas (123 coincidencias, 7 falta de coincidencia, 0 huecos, puntaje de similitud de 650), las regiones CDR1 son 87% idénticas (7 coincidencias, 1 falta de coincidencia, 0 huecos, puntaje de similitud de 37), Las regiones CDR2 son 100%

idénticas (8 coincidencias, 0 falta de coincidencia, 0 huecos, puntaje de similitud de 41), y las regiones CDR3 son 95% idénticas (22 coincidencias, 1 falta de coincidencia, 0 huecos, puntaje de similitud de 131).

Vectores de expresion

- 5 Se construyeron dos vectores de expresión de plásmidos, denominados pCB3 y pCB11, para expresar las cadenas pesada y ligera del anticuerpo en células CHO *dhfr*-.

pCB3

Este plásmido se ilustra en la Figura 3. Los componentes de este plásmido se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2 - Componentes del vector de expresión pCB3

Componente del vector	Forma corta	Función	Fuente
Factor 1 α humano de alargamiento con el primer intrón	Promotor EF1 α	Promotor de expresión	ADN genómico humano (Clontech)
Gen de resistencia a la ampicilina (β -lactamasa)	AMP ^r	propagación del plásmido en bacterias	Vector comercial (pBluescript; Stratagene)
Origen de replicación	pUCori	Replicación del plásmido en bacterias	Vector comercial (pBluescript; Stratagene)
Señal de poliadenilato del virus de Simio	SV40E poli(A)	Terminación de la transcripción	Vector comercial (pSV40; BRL/ Invitrogen)
Secuencia promotora del virus 40E de simio	Promotor SV40E	Promotor de expresión	Vector comercial (pSV40; BRL/ Invitrogen)
Señal de poliadenilato de la hormona de crecimiento bovino	BGH Poli(A)	Terminación de la transcripción	Vector comercial (BRL/ Invitrogen)
Gen de dihidrofolato reductasa	DHFR	marcador de selección de DHFR	ADNc de murino (Sierra Biosource, Inc.)

- 10 pCB11

Este plásmido se ilustra en la Figura 4. Los componentes de este plásmido se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3 - Componentes del vector de expresión pCB11

Componente del vector	Forma corta	Función	Fuente
Factor 1 α humano de alargamiento con el primer intrón	Promotor EF1 α	Promotor de expresión	ADN genómico humano (Clontech)
Gen de resistencia a la Ampicilina (β -lactamase)	AMP ^r	Propagación del plasmido en bacterias	Vector comercial (pBluescript; Stratagene)
Origen de replicación	pUCori	Replicación del plásmido en bacterias	Vector comercial (pBluescript; Stratagene)
Señal poliadenilato del virus de Simio	SV40E poli(A)	Terminación de la transcripción	Vector comercial (pSV40; BRL/Invitrogen)
Neomicina fosfotransferasa (mutante)	nuevo mutante	Marcador de selección de antibióticos	Vector comercial (pSV-Neo; BRL/Invitrogen) modificado por Sierra Biosource, Inc.
secuencia promotora del Virus 40E de simio	Promotor SV40E	Promotor de expresión	Vector comercial (pSV40; BRL/Invitrogen)
Señal de poliadenilato de la	BGH Poli(A)	Terminación de la	Vector comercial (BRL/Invitrogen)

hormona del crecimiento bovino		transcripción	
--------------------------------	--	---------------	--

Inserción de genes de inmunoglobulina recombinante en vectores de expresión

5 Se usó una segunda PCR para amplificar las HC y LC con sitios de restricción apropiados añadidos de manera que los fragmentos pudieran insertarse en vectores de expresión. El diseño de los cebadores directos específicos del gen se basó en las secuencias obtenidas. El motivo Kozak de consenso (GCCACC), conocido por aumentar la eficiencia de la traducción eucariota, se incluyó en cada cebador directo (Tabla 5).

Los cebadores (SEQ ID NOs: 20 a 27) para inserción de HC y LC de RhD1-RhD3 en vectores de expresión fueron los siguientes.

HC de RhD1:

10 Cebador directo específico de gen (GSP):

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCC-3'

HC de RhD2:

GSP directo:

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCC-3'

15 HC de RhD3:

GSP directo:

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACACACTTTGCTACACACTCC-3'

El cebador inverso utilizado para todas las cadenas pesadas:

5'-TGACGAATCCACTCATTACCCGGAGACAGG-3'

20 LC de RhD1-RhD2:

GSP directo:

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGCCTGGGCTCTGCTATTC-3'

cebador inverso:

5'-ACTGGAATTCGAACCTATGAACATTCTGTAGGGG-3'

25 LC de RhD3:

GSP directo:

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCG-3'

Cebador inverso:

5'-GACTGAATTCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3'

30 El ciclo de PCR para la inserción de las HC y LC de RhD1-RhD3 en vectores de expresión comprendió las siguientes etapas:

94°C	2 min	
94°C	20 s	\
55°C	20 s	35x
72°C	2 min (1 min para LC de RhD1, RhD2	/
72°C	10 min	

ES 2 692 173 T3

4°C mantener

Construcción de la variante de IgG3 del anticuerpo RhD1

5 Se diseñó una variante IgG3 de RhD1 como una quimera entre la región variable de RhD1 y la región constante de RhD3. La quimerización se aprovechó de los extremos 5' idénticos de las regiones constantes de RhD1 (IgG1) y RhD3 (IgG3). El cebador inverso específico para el dominio variable de RhD1 se diseñó para superponer tres codones de la región constante y para introducir mutaciones silenciosas que crearon un sitio de restricción NheI. Se introdujo una modificación idéntica en el extremo 5' de la región constante de RhD3 mediante el cebador directo. El sitio de restricción de NheI permitió una clonación conveniente en el marco del dominio variable amplificado de RhD1 frente a la región constante de RhD3. Esto se realizó en dos etapas.

10 Primero, la región constante de HC de IgG3 del anticuerpo RhD3 se amplificó, se cortó con las enzimas XbaI y EcoRI, y se ligó en el vector pCB3 digerido con XbaI/EcoRI. En la segunda etapa, este plásmido intermediario se cortó nuevamente con las endonucleasas XbaI y NheI, y se insertó la región variable amplificada de RhD1, digerida con las mismas enzimas.

15 Los cebadores (SEQ ID NO: 28-31) usados para la construcción de la variante de IgG3 de RhD fueron los siguientes.

Los cebadores utilizados para la amplificación de la región constante de RhD3:

Directo:

5'-ATCGTCTAGAGTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC-3'

Inverso:

20 5'-TGACGAATTCCACTCATTACCCGGAGACAGG-3'

Los cebadores utilizados para la amplificación del dominio variable de RhD1:

Directo:

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCC-3'

Inverso:

25 5'-GATGCTAGCTGAGGAGACGGTGATCGTGG-3'

El ciclo de PCR para la construcción de la variante de IgG3 de RhD1 comprendió los siguientes pasos:

94°C	2 min	
--		
94°C	20 s	\
55°C	20 s	35x
72°C	2 min	/
--		
72°C	10 min	
4°C	mantener	

Enzima de PCR: ADN polimerasa termoestable PfuUltra High-Fidelity (Stratagene).

30 Vectores de expresión que contienen genes de anticuerpos clonados

Las secuencias de codificación de HC de RhD1, LC de RhD1, HC de RhD2, LC de RhD2, HC de RhD3, LC de RhD3, HC de RhD1V3C (quimera compuesta por el dominio variable de la cadena pesada de RhD1 y la región constante de la cadena pesada de RhD3) que se insertan en los vectores de expresión, incluyendo también los

motivos Kozak añadidos y los sitios de restricción, se presentan como las SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38, respectivamente. La Figura 5 es un mapa de pCB3 que ilustra la ubicación de la cadena pesada del anticuerpo anti-RhD insertado, y la Figura 6 es un mapa de pCB11 que ilustra la ubicación de la cadena ligera del anticuerpo anti-RhD insertado (siendo la ubicación de la inserción la misma, independientemente de la cadena pesada o ligera específica de RhD1, RhD2, RhD3 o RhD1V3C que es expresada).

5 Optimización del gen

Las secuencias codificantes de los anticuerpos RhD1 y RhD3 se optimizaron mediante GENEART AG utilizando algoritmos patentados. Las secuencias de codificación optimizadas para HC de RhD1, LC de RhD1, HC de RhD3 y LC de RhD3 se proporcionan como laa SEQ ID NOs: 39, 40, 41 y 42, respectivamente.

10 Clonación de genes optimizados de RhD1 en vectores de expresión

Los genes optimizados para RhD1 se subclonaron en vectores de expresión pCB. Para agregar los sitios de restricción necesarios para la clonación, las regiones codificantes se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores que se enumeran a continuación. Cada fragmento amplificado se insertó en el vector respectivo y se verificó mediante secuenciación.

15 Los cebadores (SEQ ID NOs: 43 a 46) que se usaron para anexar los sitios de restricción compatibles con los vectores de expresión de pCB a los genes optimizados de RhD1 son los siguientes.

HC optimizada de RhD1:

Directo:

5'-ATCG TCTAGA GCCACCATGGACTGGACCTG-3'

20 Inverso:

5'-ATC GGGATCC TCATCACTTGCCGGGGGAC-3'

LC optimizada de RhD1:

Directo:

5'-ATCG TCTAGA GCCACCATGGCCTGGGCCC-3'

25 Inverso:

5'-ATCG GGATCC TCATCAGCTGCACTCGGTGGGG-3'

Los sitios de XbaI y BamHI en los cebadores están subrayados.

30 Las secuencias de codificación optimizadas de HC de RhD1 y LC de RhD1 como las insertadas en los vectores de expresión, incluidos los motivos Kozak añadidos y los sitios de restricción, se proporcionan como las SEQ ID NOs: 47 y 48.

Cultivo celular

Medios de cultivo

35 El medio de cultivo MEM α se usó en todas las etapas del trabajo de desarrollo de la línea celular CHO recombinante. Los componentes, formulación y fuentes del material se muestran en la Tabla 4. Después de la adición de todos los componentes, se filtró el medio completo a través de un filtro de 0,22 μ m (unidad filtrante de 0,22 μ m, Stericup-GP Millipore o equivalente).

Tabla 4 - Medios de cultivo

Medio	Componentes	Proveedores	Catálogo #	Concentration final
Medio de cultivo 1 de células huésped CHO DXB11	MEM α	Gibco o Cellgro	32561-037 o CV2561-049	1x
	sin ribonucleósidos y desoxiribonucleósidos HT, 250x			1x
	Suero fetal bovino dializado (dFBS)	Gibco	31985-070 SH30079.33	1x

	irradiado con radiación gamma GlutaMax, 100x	Hyclone Gibco	35050-061	7,5% 1x
Medio de cultivo 2 de células huésped CHO DXB11	MEMα	Gibco	32571-036	1x
	sin ribonucleósidos y desoxiribonucleósidos,	Hyclone	SH30070.03	7,5%
	Suero fetal bovino (FBS) irradiado con radiación gamma, GlutaMax, 100x	Gibco	35050-061	1x
Medio de selección transfectante	MEMα	Gibco o Cellgro	32561-037 o CV2561-049	1x
	sin ribonucleósidos y desoxiribonucleósidos	Hyclone	SH30079.33	1x
	dFBS, irradiado con radiación gamma, GlutaMax, 100x	Gibco	35050-061	7,5% 1x
	Geneticina (una formulación de G-418)	Gibco	10131-027	0,5 mg/mL

Medios de congelación

La composición de los medios de congelación utilizados para crioconservación de células se proporciona en la Tabla 5.

5

Tabla 5 - Componentes de los medios de congelación

Medio de congelación 1:			
Componentes	proveedores	Catálogo #	Volumen por 100 mL
dFBS irradiado con radiación gamma	HyClone	SH30079.33	95 mL
dimetil sulfoxido (DMSO)	Sigma	D2438	5 mL

Medio de congelación 2:			
Componentes	Proveedores	Catálogo #	Volumen por 100 mL
FBS irradiado con radiación gamma	HyClone	SH30070.03	90 mL
DMSO	Sigma	D2438	10 mL

Mantenimiento de las células

10 Se cultivaron células CHO DXB11 deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) en medio 1 o 2 de cultivo de células huésped (Tabla 4) y se dividieron cada 3-4 días.

Densidad celular y mediciones de viabilidad.

La densidad de células viables y la viabilidad celular se determinaron usando el método de exclusión con Trypan Blue y un hemocitómetro (Hausser Scientific).

Transfección estable y amplificación en metotrexato (MTX)

15 Las células CHO DXB11 se cotransfectaron con cantidades iguales de ADN plasmídico que codifica para las cadenas ligera y pesada de la IgG humana (Tabla 6). Las transfecciones se realizaron utilizando el reactivo

Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los transfectantes estables se seleccionaron utilizando un medio de selección transfectante (Tabla 4).

Tabla 6 - Condiciones para una transfección típica de células CHO DXB11

Recipiente	Cantidad de ADN de HC	Cantidad de ADN de LC	Cantidad de Lipofectamina 2000
Matraz T75 o placa de 10 cm	15µg	15µg	30-75 µL

5 Las células transfectadas se cultivaron durante 2 días a 37°C y 5% de CO₂ en el medio de cultivo 1 o 2 de célula huésped antes del inicio del proceso de selección reemplazando el medio de cultivo con el medio de selección transfectante (Tabla 4).

10 Durante el proceso de selección, el medio gastado se eliminó y se reemplazó con medio fresco cuando fue necesario. Después de que se completó el proceso de selección y las células transfectadas volvieron a crecer, las células fueron

- transferidas al medio de selección transfectante (Tabla 4) que contiene varios niveles de MTX (Calbiochem) para la amplificación de los genes del anticuerpo, o

- subclonadas (véase más abajo). En este caso, se seleccionaron 12 clones de la mejor producción y se agruparon para una amplificación adicional en MTX.

15 Clonación de células individuales

20 Con el fin de seleccionar clones de una sola célula, las células transfectadas de manera estable se colocaron en placas en un número apropiado de placas de 96 pozos de fondo plano a razón de 0,5-1 células por pozo. Durante el proceso, el crecimiento y salud de las células se controló bajo el microscopio. Las células se cultivaron durante aproximadamente dos semanas antes de la selección de los mejores clones productores mediante cribado por ELISA.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

25 Los títulos de anticuerpos durante todas las etapas del desarrollo de la línea celular se evaluaron con el kit de cuantificación de IgG humana de ELISA (Bethyl Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las placas Nunc Maxisorp para ELISA se recubrieron con anticuerpo policlonal anti-IgG humano de cabra específico para Fc en solución salina regulada con fosfato (PBS). Las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces y se bloquearon durante 1 hora con leche en polvo sin grasa disuelta en el regulador de lavado. Después de la etapa de lavado, las muestras y los estándares se pipetearon en las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de tres lavados. Luego se añadió anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pozo y las placas se incubaron nuevamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con regulador de lavado, se enjuagaron una vez con agua destilada y se secaron. Se añadió a cada pozo un sustrato que contenía tetrametilbenzidina (TMB) y se dejó que se desarrollara el color durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico y las placas se leyeron en un lector de placas (Bio-Rad, Molecular Dynamics o Dynex Technologies) a 450 nm. Los datos se analizaron con un paquete de software suministrado con el lector de placas.

35 Expresión de anticuerpos recombinantes de agrupaciones de células transfectadas de forma estable con ADNc no optimizados

El esquema de transfecciones (realizado según la Tabla 6) y las designaciones de las células transfectadas se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7 - Nombre designado para los grupos transfectados.

ADN de HC en pCB3	ADN de LC en pCB11	Nombre del grupo estable	Isotipo de IgG recombinante
RhD1 gamma	RhD1 lambda	RhD1	IgG1
RhD1V3C gamma	RhD1 lambda	RhD4	IgG3
RhD2 gamma	RhD2 lambda	RhD2	IgG1
RhD3 gamma	RhD3 kappa	RhD3	IgG3

40

En general, se alcanzó una mejor expresión cuando las células transfectadas se subclonaron después del proceso de selección, los clones se clasificaron para la producción de anticuerpos por ELISA y solo los grupos de 12 clones con mejor producción se amplificaron en MTX. La amplificación de transfectantes seleccionados pero no subclonados dio como resultado grupos que exhibían una menor productividad, aunque en un tiempo más corto. A continuación se muestra un esquema típico de amplificación de MTX:

- Las células seleccionadas (MTX 0 nM) se transfirieron en paralelo al medio de selección transfectante que contiene MTX 50 nM o 100 nM (Etapa 1)
- Las células recuperadas de la etapa 1 se expandieron y se dividieron en MTX 200 nM y 500 nM (etapa 2)
- Las células que sobrevivieron a la etapa 2 se expandieron y se sometieron a amplificación en MTX 1000 nM (etapa 3)

En cada etapa, la productividad del anticuerpo se evaluó mediante ELISA (Tabla 8).

Tabla 8 - Ejemplos de productividad de grupos no amplificados y amplificados de los 12 mejores clones

Grupos de los 12 mejores clones	Nivel de MTX (nM)	Niveles de expresión de anticuerpos después de 7 días de cultivo (mg/ml)
RhD1	0	10,8
RhD1	50	5,66
RhD1	200	6,44
RhD1	500	9,12
RhD1	1000	27,8
RhD2	0	9,25
RhD2	50	12,25
RhD2	100	12,75
RhD2	200	18,4
RhD3	0	4,08
RhD3	200	3,14
RhD3	500	6,85
RhD4	0	1,2
RhD4	0	2

Los grupos que produjeron los mejores títulos de anticuerpos se expandieron en matraces de cultivo de tejidos en medio de selección transfectante (sin MTX y Geneticina y que contenían FBS con baja IgG de bovino en lugar de FBS regular). Los sobrenadantes de estos cultivos se recogieron y se usaron para la purificación de los anticuerpos.

Expresión de anticuerpos RhD1 y RhD3 por poblaciones de células clonales transfectadas y amplificadas adaptadas a medios sin suero.

Como los niveles de expresión de anticuerpos obtenidos de los grupos de células (Tabla 8) aún no eran tan altos como se deseaba, el proceso de transfección, selección y amplificación se llevó a cabo nuevamente, esta vez empleando una etapa de subclonación (como se describió anteriormente) después de cada etapa de amplificación, además después de la etapa de selección inicial, para obtener líneas celulares clonales (clones de células individuales) que expresan niveles amplificados de anticuerpo anti-RhD.

Más específicamente, las células CHO DXB11 se transfectaron con plásmidos que codifican las cadenas pesada y ligera de RhD1 o RhD3. La transfección y selección de células transfectadas de manera estable se llevó a cabo esencialmente de la misma manera que se describió anteriormente. Las células transfectadas se subclonaron y los

clones resultantes se cribaron para la producción de anticuerpos. Las líneas celulares clonales más productivas fueron amplificadas. Después de la amplificación, las células se subclonaron nuevamente y los clones más productivos se sometieron a una ronda adicional de amplificación y subclonación. Los medios de selección y los medios de amplificación utilizados para la primera y segunda etapas de amplificación, se enumeran en la Tabla 9.

5 Las líneas celulares clonales finales mejor producidas (obtenidas después de ambas rondas de amplificación) se adaptaron al cultivo de la suspensión en medios comerciales sin suero (IS CHO_CD4^{MR}, Irvine Scientific). Esta tarea se realizó en los matraces de agitación o en botellas giratorias sembrando las células en una mezcla 1:1 del medio de amplificación final (Tabla 9) y un medio sin suero que contenía el mismo nivel de MTX, y luego aumentando gradualmente la proporción del medio sin suero durante un período de cuatro a seis semanas hasta que las células fueron completamente capaces de crecer en medio sin suero al 100%.

Las productividades máximas de las mejores líneas celulares clonales productoras de RhD1 y RhD3, antes y después de la adaptación a medios sin suero, se enumeran en la Tabla 9. Los sobrenadantes de estos cultivos se recogieron de nuevo y se usaron para la purificación de los anticuerpos.

15 Tabla 9 - Medios de selección y amplificación para cinco clones RhD seleccionados. Se incluyen datos de productividad antes y después de la adaptación al medio sin suero.

Clon recombinante:		Clon 1 de RhD1	Clon 6 de RhD1	Clon1 de RhD3	Clon 4 de RhD3
Optimización del gen:		Sí	Sí	No	No
Medios de Selección y Amplificación. La composición del medio de selección transfectante se enumera en la Tabla 4.	Selección:	Medio de selección transfectante	Medio de selección transfectante	Medio de selección transfectante MTX 20 nM	Medio de selección transfectante MTX 20 nM
	Etapas 1 de amplificación:	Medio de selección transfectante No G418 300nM MTX	Medio de selección transfectante No G418 MTX 300 nM	Medio de selección transfectante No G418 MTX 200 nM	Medio de selección transfectante No G418 MTX 200 nM
	Etapas 2 de amplificación:	Medio de selección transfectante No G418 MTX 2.400 nM	Medio de selección transfectante No G418 MTX 1.200 nM	Medio de selección transfectante No G418 MTX 800 nM	Medio de selección transfectante No G418 MTX 800 nM
Productividad del anticuerpo	Antes de la adaptación al medio sin suero	87 µg/mL	100 µg/mL	128 µg/mL	87 µg/mL
	Después de la adaptación al medio sin suero	419 µg/mL	431 µg/mL	320 µg/mL	326 µg/mL

Purificación de anticuerpos

20 El pH de los sobrenadantes de cultivo se ajustó a pH 7,2 con NaOH 1 N. Cada sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 µ y se cargó en una columna de proteína A previamente equilibrada en solución salina regulada con fosfato (PBS). La columna se lavó con PBS para eliminar todo el material no unido del sobrenadante de cultivo. El anticuerpo unido a la columna de proteína A se eluyó con glicina 0,1 M (pH 2,5). El eluato se neutralizó con regulador Tris 2 M ajustado a pH 8,0. El eluato que contenía anticuerpo monoclonal se dializó frente a PBS. La concentración de anticuerpos anti-RhD se determinó mediante un ensayo de aglutinación usando eritrocitos D positivos. La concentración de anticuerpos se determinó espectrofotométricamente a 280 nm utilizando un valor de densidad óptica de 1,4 OD para una solución de 1 mg/mL basada en el coeficiente de extinción molar para el anticuerpo monoclonal humano.

Ensayo de cuantificación anti-D mediante hemaglutinación

Los niveles de anticuerpos anti-RhD en los sobrenadantes y el anticuerpo purificado se cuantificaron midiendo la aglutinación de eritrocitos RhD positivos tratados con bromelaina utilizando el sistema Technicon Autoanalyzer como

se describió anteriormente por Gunson et. al (HH Gunson, PK Phillips y F. Stratton J. Clin. Path., 1972, 25, 198-205. Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-RhD de NIBSC (2do estándar internacional 01/572) como estándar.

5 En resumen, los glóbulos rojos RhD positivos tratados con bromelina se incuban con diversas concentraciones de anticuerpos anti-RhD. Las células se dejan aglutinar durante un período de tiempo. Las células aglutinadas se eliminan en el autoanализador y el resto de los eritrocitos se lisan con detergente. La densidad óptica de la hemoglobina liberada se mide espectrofotométricamente. Las concentraciones de anti-D de las muestras se calculan utilizando un gráfico estándar obtenido de varias concentraciones del estándar Anti-D.

Ensayo de citometría de flujo

10 Cada anticuerpo humano monoclonal anti-RhD se diluyó en serie 1 en 3 por debajo de 0,5 mg/mL para preparar el total de 15 diluciones. Cada dilución se añadió a $1-5 \times 10^5$ glóbulos rojos humanos (RBC) RhD positivos o RhD negativos, con genotipos por lo demás similares, pretratados con papaína para hacer que los componentes antigénicos de RhD sean más accesibles a los anticuerpos. Se usó un anticuerpo anti-IgG humano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) como un anticuerpo secundario para teñir anticuerpos unidos a los RBC.

15 Las muestras se analizaron en el instrumento FACSsort (Becton-Dickinson). La población de glóbulos rojos se clasificó según los parámetros de dispersión hacia delante y hacia los lados. La fluorescencia de las muestras RhD negativas se consideró como referencia, ya que estas células carecen del antígeno RhD al que se dirigen los anticuerpos anti-RhD. Las células RhD negativas incubadas con una concentración particular de anticuerpo, por lo tanto, sirvieron como control negativo para las células RhD positivas incubadas con la misma dilución de anticuerpos. Luego se determinaron la fluorescencia específica y el porcentaje de células RhD positivas unidas por el anticuerpo anti-RhD (y teñidas con IgG antihumana marcada con FITC), para cada dilución de anticuerpo anti-RhD, con base en la diferencia entre el nivel de fluorescencia en las muestras RhD positivas y RhD negativas. Para cada anticuerpo anti-RhD, el porcentaje de células positivas unidas por el anticuerpo se graficó frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo, y se estimó la EC50 a partir de este gráfico. Esto proporcionó información básica sobre la afinidad de unión y la especificidad de los anticuerpos para el antígeno RhD.

25 Ensayo de ADCC

La eficacia de los anticuerpos anti-RhD para eliminar los glóbulos rojos RhD positivos *in vivo*, y por lo tanto la utilidad de los anticuerpos para prevenir la inmunización de un individuo RhD negativo expuesto a sangre RhD positiva, se midió mediante un ensayo de toxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

30 El ensayo de ADCC se basó en el método descrito por Miescher et al. (British Journal of Hematology 2000 111: 157-166). Los eritrocitos RhD positivos se trataron con papaína y posteriormente se marcaron con el colorante fluorescente 5-(y 6) éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína. Los eritrocitos marcados se preincubaron con concentraciones variables (0,1-50 ng/mL) de anticuerpos anti-RhD durante 1 hora. Se añadieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a la suspensión de eritrocitos y se incubaron durante 18 horas en una incubadora de CO₂ a 37°C. La extensión de la lisis de las células objetivo al final de la incubación se determinó midiendo la liberación del colorante de los glóbulos rojos lisados en el sobrenadante con un fluorómetro. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ lisis específica} = \frac{F_{C_{exp}} - F_{C_{med}}}{F_{C_{det}} - F_{C_{med}}} \times 100$$

en la que

$F_{C_{exp}}$ = fluorescencia de las muestras

40 $F_{C_{det}}$ = control de fluorescencia máxima (obtenido al lisar los RBC con un detergente (Triton-X100 al 1%))

$F_{C_{med}}$ = control de fluorescencia de referencia (liberación espontánea del colorante de los RBC en ausencia de PBMC y anticuerpo)

El porcentaje de citotoxicidad se graficó luego en función del logaritmo de la concentración de anticuerpos a la que se preincubaron los eritrocitos, y estos datos se utilizaron para calcular la EC50, es decir, la concentración efectiva de anticuerpos que causa el 50% de la lisis específica máxima alcanzable por ese anticuerpo. A modo de ejemplo, la Fig. 7 es un gráfico del porcentaje de citotoxicidad de nuevo la concentración de anticuerpo generada a partir de los resultados de un ensayo de ADCC utilizando un estándar de NIBSC (anticuerpos policlonales anti-RhD). Esta dependencia dosis-respuesta teóricamente produce una curva sigmoidea con una región media casi lineal. Para realizar una aproximación lineal en esta región, se puede ajustar una línea recta a los puntos de datos pertinentes mediante regresión lineal utilizando un paquete de software adecuado (tal como, por ejemplo, Microsoft Excel^{MR}). La Fig. 8, por ejemplo, es una regresión lineal realizada en los puntos de datos relevantes de la Fig. 7. Una ecuación que representa esta línea recta se puede usar para calcular la EC50. Por ejemplo, para los datos de la Fig. 7, donde

la lisis específica máxima causada por el anticuerpo policlonal estándar de NIBSC fue aproximadamente del 88% en comparación con la lisis inducida por el detergente (100%), se calculó el valor de EC50 para el valor de lisis específica igual a 44 %.

Resultados del ensayo de hemaglutinación y ADCC

- 5 Los resultados de los ensayos de hemaglutinación y ADCC, realizados de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, se muestran a continuación en la Tabla 10. Los títulos de aglutinación se expresan como microgramos de anticuerpo activo (unión al antígeno RhD) por mg de proteína. Los valores de EC50 se determinaron a partir de dos experimentos independientes.

10 Tabla 9 - Títulos de aglutinación y valores de EC50 para los anticuerpos RhD1, RhD3 y RhD4. Se incluyen un anticuerpo policlonal de control (estándar de NIBSC) y dos lotes de un anticuerpo monoclonal de control para la comparación.

Anticuerpo	Título de aglutinación (µg de Ab activo por mg de proteína)	EC50 de ADCC (ng de Ab activo/mL)		
		Experimento 1	Experimento 2	Promedio
mAb anti-RhD de control Lote No, 1	100,0	1,2	2,1	1,7
mAb anti-RhD de control Lote No, 2	100,0	0,9	1,9	1,4
Estándar de NIBSC (Ab policlonal anti- RhD)	7,1	0,5	1,3	0,9
Clon 1 de RhD1	716,2	0,7	1,5	1,1
Clon 6 de RhD1	378,1	0,4	0,9	0,7
Clon 1 de RhD3	324,3	0,2	0,3	0,3
Clon 4 de RhD3	275,3	0,1	0,2	0,2
RhD4	303,3	0,1	0,5	0,3

Formulaciones

- 15 Los anticuerpos anti-RhD monoclonales purificados se pueden formular para administración por cualquier vía adecuada. Típicamente, los anticuerpos se administran a través de inyección. En tales circunstancias, el anticuerpo se formula típicamente como una suspensión líquida de los anticuerpos en una solución reguladora adecuada. Los ejemplos de reguladores incluyen:

solución salina regulada con fosfato (regulador de fosfato 20 mM (pH 6,8) que contiene NaCl 150 mM); y

regulador de solución salina de glicina (glicina 0,3 M que contiene NaCl 0,15 M ajustada a pH 6,5).

- 20 Las formulaciones preferidas comprenden tanto anticuerpos monoclonales que tienen una región constante de IgG1 como anticuerpos monoclonales que tienen una región constante de IgG3. Por lo tanto, se prefieren las formulaciones que comprenden anticuerpos RhD1 (que son del isotipo IgG1) en combinación con anticuerpos RhD3 (que son del isotipo IgG3) y/o anticuerpos RhD4 (que consisten en la cadena pesada RhD1V3C y la cadena ligera RhD1).

- 25 Listado de secuencias

<110> BHARAT SERUMS AND VACCINES LTD.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-RHD

<130> PCT-ANTID-01

<150> 2730/MUM/2008

ES 2 692 173 T3

<151> 31 de diciembre de 2008

<160> 48

SEQ ID NO: 1 (secuencia de nucleótidos de la región codificante de HC de RhD1)

Péptido señal: 1-57

5 Región variable: 58-448

CDR1: 133-156

CDR2: 208-231

CDR3: 346-414

Región constante: 449-1437 (gamma1)

```

1      M D W T W R F L F V V A A A T G V Q S Q
      ATG GAC TGG ACC TGG AGG TTC CTC TTT GTG GTG GCA GCA GCT ACA GGT GTC CAG TCC CAG

61     V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S
      GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG AAG GTC TCC

121    C K A S G G I F R T Y A I S W V R Q A P
      TGC AAG GCT TCT GGA GGC ATC TTC AGA ACC TAT GCT ATC AGC TGG GTG CGA CAG GCC CCT

181    G Q G L E W M G G I I P M F G T V N Y A
      GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATG TTT GGT ACA GTA AAC TAC GCA

241    Q K F Q G R V T I S A D K S T S T A Y M
      CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT AGC GCG GAC AAA TCC ACG AGC ACA GCC TAT ATG

301    E L S R L R S E D T A V Y Y C A R P P S
      GAA CTG AGC AGA CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG CCG CCT TCC

361    G G C G G D C S R R G Y Y Y A M D V W G
      GGG GGT TGT GGT GGT GAC TGC TCA CGG AGG GGC TAC TAC TAC GCC ATG GAC GTC TGG GGC

421    Q G T T I T V S S A S T K G P S V F P L
      CAA GGG ACC ACG ATC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG

481    A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D
      GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC

541    Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H
      TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC

601    T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V
      ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG

661    P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N
      CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC

721    T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P
      ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG

781    C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K
      TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG

841    D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H
      GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC

      E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K
  
```

ES 2 692 173 T3

```

901   GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG
      T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V
961   ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC

      L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L
1021  CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC

      P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V
1081  CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG

      Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L
1141  TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG

      V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E
1201  GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG

      N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S
1261  AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC

      K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
1321  AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG

      H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *
1381  CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
  
```

SEQ ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos de HC de RhD1)

```

1     MDWTWRFLFV VAAATGVQSQ VQLVQSGAEV KKPSSSVKVS CKASGGIFRT YAISWVRQAP
61    GQGLEWMGGI IPMFGTVNYA QKFQGRVTIS ADKSTSTAYM ELSRLRSEDV AVYYCARPPS
121   GGCGGDCSRR GYYYAMDVWG QGTTITVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
181   YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFFAVLQSSG LYSLSVTVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN
241   TKVDKKVEPK SCDKHTCPCP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPV VTCVVVDVSH
301   EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRIVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
361   PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
421   NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KLSLSLSPGK
  
```

SEQ ID NO: 3 (secuencia de nucleótidos de la región codificante de LC de RhD1)

5 Péptido señal: 1-57

Región variable: 58-388

CDR1: 133-159

CDR2: 211-219

CDR3: 328-357

10 Región constante: 389-705 (lambda)

```

1     M A W A L L F L T L L T Q G T G S W A Q
      ATG GCC TGG GCT CTG CTA TTC CTC ACC CTC CTC ACT CAG GGC ACA GGG TCC TGG GCC CAG
61    S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S
      TCT GCC CTG ACT CAA CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA CAG TCG ATC ACC ATC TCC
121   C S G S S S D V G G Y K Y V S W Y Q Q H
      TGC AGT GGA AGC AGC AGT GAC GTT GGT GGT TAT AAG TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAA CAC
181   P G K A P Q L M I Y D V N N R P S G V S
      CCA GGC AAA GCC CCC CAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AAT AAT CGG CCC TCA GGG GTT TCT
241   N R F S G S K S G N T A S L T I S G L Q
      AAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG ACC ATC TCT GGG CTC CAG
301   A E D E A D Y Y C S S Y T S S S T R V F
      GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC AGC TCA TAT ACA AGC AGC AGC ACT CGA GTG TTC
361   G G G T K L T V L G Q P K A A P S V T L
      GGC GGA GGG ACG AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT CTG
  
```

ES 2 692 173 T3

```

F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S
421 TTC CCA CCC TCC TCT GAG GAG CTT CAA GCC AAC AAG GCC ACA CTG GTG TGT CTC ATA AGT

D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A
481 GAC TTC TAC CCG GGA GCC GTG ACA GTG GCC TGG AAG GCA GAT AGC AGC CCC GTC AAG GCC
G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y
541 GGA GTG GAG ACC ACC ACA CCC TCC AAA CAA AGC AAC AAC AAG TAC GCG GCC AGC AGC TAC

L S L T P E Q W K S H K S Y S C Q V T H
601 CTG AGC CTG ACG CCT GAG CAG TGG AAG TCC CAC AAA AGC TAC AGC TGC CAG GTC ACG CAT

E G S T V E K T V A P T E C S *
661 GAA GGG AGC ACC GTG GAG AAG ACA GTG GCC CCT ACA GAA TGT TCA TAG
    
```

SEQ ID NO: 4 (LC de RhD1: secuencia de aminoácidos)

```

1 MAWALLFLTL LTQGTGSWAQ SALTQPASVS GSPGQSITIS CSGSSSDVGG YKYVSWYQQH
61 PGKAPQLMIY DVNNRPSGVS NRFSGSKSGN TASLTISGLQ AEDEADYYCS SYTSSSTRVF
121 GGGTKLTVLG QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
181 GVETTPSKQ SNNKYAASSY LSLTPEQWKS HKSYSQVTH EGSTVEKTV PTECS
    
```

SEQ IDNO: 5 (secuencia de nucleótidos de la región codificante de HC de RhD2)

5 Péptido señal: 1-57

Región variable: 58-448

CDR1: 133-156

CDR2: 208-231

CDR3: 346-414

10 Región constante: 449-1437 (gamma1)

```

M D W T W R F L F V V A A A T G V Q S Q
1 ATG GAC TGG ACC TGG AGG TTC CTC TTT GTG GTG GCA GCA GCT ACA GGT GTC CAG TCC CAG

V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S
61 GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG AAG GTC TCC

C K P S G G I F S T Y A I S W V R Q A P
121 TGC AAA CCT TCT GGA GGC ATC TTC AGC ACC TAT GCT ATC AGC TGG GTG CGA CAG GCC CCG

G Q G L E W M G G I I P M F G T V N Y A
181 GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATG TTT GGG ACA GTA AAC TAC GCA

Q K F Q G R V T I S A G K S T S T A D M
241 CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATT AGC GCG GGC AAA TCC ACG AGC ACA GCC GAT ATG

E L S R L R S E D T A V Y Y C A R P P S
301 GAA CTG AGC AGA CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG CCG CCT TCC

G G C G G D C S R R G Y Y Y G M D V W G
361 GGG GGT TGT GGT GGT GAC TGC TCA CCG AGG GGC TAT TAT TAT GGT ATG GAC GTC TGG GGC

Q G T T V I V S S A S T K G P S V F P L
421 CAA GGG ACC ACG GTC ATC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG

A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D
481 GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC

Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H
541 TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC

T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V
601 ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG

P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N
661 CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC

T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P
721 ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG
    
```


ES 2 692 173 T3

781 C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K
TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG

841 D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H
GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC

901 E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K
GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG

961 T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V
ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC

1021 L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L
CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC

1081 P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V
CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG

1141 Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L
TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG

1201 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E
GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG

1261 N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S
AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC

1321 K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG

1381 H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *
CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA

SEQ ID NO: 6 (HC de RhD2: secuencia de aminoácidos)

1 MDWTWRFLFV VAAATGVQSQ VQLVQSGAEV KKPSSVKVS CKPSGGIFST YAIWVRQAP
61 GQGLEWMGGI IPMFGTVNYA QKFQGRVTIS AGKSTSTADM ELSRLRSEDV AVYYCARPPS
121 GGCGDCSRR GYYYGMDWVG QGTTVIVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
181 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN
241 TKVDKKEVEPK SCDKTHCPP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
301 EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
361 PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
421 NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALTHNHHTQ KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 7 (secuencia de nucleótidos de la región codificante de LC de RhD2)

5 Péptido señal: 1-57

Región variable: 58-388

CDR1: 133-159

CDR2: 211-219

CDR3: 328-357

10 Región constante: 389-705 (lambda)

1 M A W A L L F L T L L T Q G T G S W A Q
ATG GCC TGG GCT CTG CTA TTC CTC ACC CTC CTC ACT CAG GGC ACA GGG TCC TGG GCC CAG

61 S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S
TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA CAG TCG ATC ACC ATC TCC

121 C S G S S S D V G A Y K Y V S W Y Q Q H
TGC AGT GGA AGC AGC AGT GAC GTT GGT GCT TAT AAG TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAA CAC

P G K T P K L M I Y D V N N R P S G V S

ES 2 692 173 T3

```

181   CCA GGC AAA ACC CCC AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AAT AAT CGG CCC TCA GGG GTT TCT
      D R F S G S K S G N T A F L T I S G L Q
241   GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TTT CTG ACC ATC TCT GGG CTC CAG
      A E D E A D Y Y C N S Y T S S S T R V F
301   GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC AAC TCA TAT ACA AGC AGC AGC ACT CGA GTG TTC
      G G G T K L T V L G Q P K A A P S V T L
361   GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT CTG
      F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S
421   TTC CCA CCC TCC TCT GAG GAG CTT CAA GCC AAC AAG GCC ACA CTG GTG TGT CTC ATA AGT
      D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A
481   GAC TTC TAC CCG GGA GCC GTG ACA GTG GCC TGG AAG GCA GAT AGC AGC CCC GTC AAG GCG
      G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y
541   GGA GTG GAG ACC ACC ACA CCC TCC AAA CAA AGC AAC AAC AAG TAC GCG GCC AGC AGC TAC
      L S L T P E Q W K S H K S Y S C Q V T H
601   CTG AGC CTG ACG CCT GAG CAG TGG AAG TCC CAC AAA AGC TAC AGC TGC CAG GTC ACG CAT
      E G S T V E K T V A P T E C S *
661   GAA GGG AGC ACC GTG GAG AAG ACA GTG GCC CCT ACA GAA TGT TCA TAG
  
```

SEQ ID NO: 8 (LC de RhD2: secuencia de aminoácidos)

```

      1   MAWALLFLTL LTQGTGSWAQ SALTQPASVS GSPGQSITIS CSGSSSDVGA YKYVSWYQQH
      61   PGKTPKLMY DVNNRPSGVS DRFSGSKSGN TAFLTISGLQ AEDEADYYCN SYTSSSTRVF
      121  GGGTKLTVLG QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
      181  GVETTPSKQ SNNKYAASSY LSLTPEQWKS HKSYSQVTH EGSTVEKTVA PTECS
  
```

SEQ ID NO: 9 (secuencia de nucleótidos de la región codificante de HC de RhD3)

5 Péptido señal: 1-57

Región variable: 58-448

CDR1: 133-162

CDR2: 214-234

CDR3: 349-414

10 Región constante: 449-1578 (gamma3)

```

      1   M D T L C Y T L L L L T T P S W V L S Q
      ATG GAC ACA CTT TGC TAC ACA CTC CTG CTG CTG ACC ACC CCT TCC TGG GTC TTG TCC CAG
      V T L K E S G P V L V K P T E T L T L T
      61   GTC ACC TTG AAG GAG TCT GGT CCT GTG CTG GTG AAA CCC ACA GAG ACC CTC ACG CTG ACC
      C T V S G F S L N N A R M G V S W I R Q
      121  TGC ACC GTC TCT GGG TTC TCA CTC AAC AAT GCT AGA ATG GGT GTG AGC TGG ATC CGT CAG
      P P G K A L E W L A H I F S N D E K S Y
      181  CCC CCA GGG AAG GCC CTG GAG TGG CTT GCA CAC ATT TTT TCG AAT GAC GAA AAA TCC TAC
      S T S L K S R L T I S K D T S K S Q V F
      241  AGC ACA TCT CTG AAG AGC AGG CTC ACC ATC TCC AAG GAC ACC TCC AAA AGC CAG GTG TTC
      L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R T P
      301  CTT ACC ATG ACC AAC ATG GAC CCT GTG GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCA CGG ACC CCT
      I T M V R G A I R L Y Y Y Y Y M D V W G
      361  ATT ACT ATG GTT CGG GGA GCT ATT AGG CTA TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC
      K G T T V T V S S A S T K G P S V F P L
      421  AAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCT TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG
      A P C S R S T S G G T A A L G C L V K D
  
```

ES 2 692 173 T3

```

481   GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC
      Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H
541   TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC
      T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V
601   ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG
      P S S S L G T Q T Y T C N V N H K P S N
661   CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ACC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC
      T K V D K R V E L K T P L G D T T H T C
721   ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG CTC AAA ACC CCA CTT GGT GAC ACA ACT CAC ACA TGC
      P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E
781   CCA CGG TGC CCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC ACA CCT CCC CCG TGC CCA CGG TGC CCA GAG
      P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D
841   CCC AAA TCT TGT GAC ACA CCT CCC CCA TGC CCA CGG TGC CCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC
      T P P P C P R C P A P E L L G G P S V F
901   ACA CCT CCC CCA TGC CCA CGG TGC CCA CCT GAA CCA CTG GGA GGA CCG TCA GTC TTC
      L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C
961   CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAT ACC CTT ATG ATT TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC
      V V V D V S H E D P E V Q F K W Y V D G
1021  GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCC GAG GTC CAG TTC AAG TGG TAC GTG GAC GGC
      V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R
1081  GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TTC CGT
      V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
1141  GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC

      K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G
1201  AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA ACC AAA GGA
      Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
1261  CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC
      Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W
1321  CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG
      E S S G Q P E N N Y N T T P P M L D S D
1381  GAG AGC AGC GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAC ACC ACG CCT CCC ATG CTG GAC TCC GAC
      G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
1441  GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC
      I F S C S V M H E A L H N R F T Q K S L
1501  ATC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CGC TTC ACG CAG AAG AGC CTC
      S L S P G K *
1561  TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
  
```

SEQ ID NO: 10 (HC de Rhd3: secuencia de aminoácidos)

```

1     MDTLCYLLLL LTPSWWLSQ VTLKESGPVL VKPTETLTLT CTVSGFSLNN ARMGVSWIRQ
61    PPGKALEWLA HIFSNDEKSY STSLKSRLTI SKDTSKSQVF LTMTNMDPVD TATYICARTP
121   ITMVRGAIRL YYYYYMDVWG KGTTVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSGG TAALGCLVKD
181   YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYLSSVTV PSSSLGTQTY TCNVNHKPSN
241   TKVDKRVELK TPLGDTTHTC PRCPEPKSCD TPPPCPRCPE PKSCDTPPPC PRCPEPKSCD
301   TPPPCPRCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVQFKWYVDG
361   VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKTKG
421   QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESSGQPENNY NTPPMLDSD
481   GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN IFSCSVMHEA LHNRF TQKSL SLSPGK
  
```

SEQ ID NO: 11 (secuencia de nucleótidos de la región codificante de LC de Rhd3)

5 Péptido señal: 1-66

Región variable: 67-391

CDR1: 145-162

CDR2: 214-222

CDR3: 331-360 (kappa)

ES 2 692 173 T3

Región constante: 392-711

```

1      ·M D M R V P A Q L L G L L L W L R G A
      ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTA CTC TGG CTC CGA GGT GCC

61     R C D I Q V T Q S P S S L S A S V G D R
      AGA TGT GAC ATC CAG GTG ACC CAG TCT CCG TCC TCC CTG TCT GCG TCT GTA GGA GAC AGA

121    V T I N C R A S Q S I G T Y L N W Y Q Q
      GTC ACC ATC AAT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GGC ACC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG

181    K P G K A P N L L I Y A A S S L Q S G V
      AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAC CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAG AGT GGG GTC

241    P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L
      CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG

301    Q P E D F A T Y Y C Q Q T Y S T P T W T
      CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG ACT TAC AGT ACC CCC ACG TGG ACG

361    F G R G T K V E I K R T V A A P S V F I
      TTC GGC CGA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAG CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC

421    F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N
      TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT

481    N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G
      AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT

541    N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S
      AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC

601    T L T L S K A D Y E K H K L Y A C E V T
      ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA CTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC

661    H Q G L S S P V T K S F N R G E C *
      CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG
  
```

SEQ ID NO: 12 (LC de Rhd3: secuencia de aminoácidos)

```

1      MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RCDIQVTQSP SSSLASVGDRTVINCRASQS
      IGTYLNWYQQ
61     KPGKAPNLLI YAASSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC
      QQTYSTPTWT
121    FGRGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ
      WKVDNALQSG
181    NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKLYACEVT HQGLSSPVTK
      SFNRGEC
  
```

5 SEQ ID NO: 13 (cebador directo de PCR)

5'-GACTGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

SEQ ID NO: 14 (cebador inverso de cadena gamma de PCR)

5'-ACTGGAATTCGGTGCTTTATTTCCATGCTGG-3'

SEQ ID NO: 15 (cebador inverso de cadena gamma de PCR)

10 5'-ACTGGAATTCGTACGTGCCAAGCATCCTCG-3'

SEQ ID NO: 16 (cebador inverso de cadena kappa de PCR)

5'-ACTGGAATTCAGAGGCCAAAGGATGGGAGG-3'

SEQ ID NO: 17 (cebador inverso de cadena kappa de PCR)

5'-GACTGAATTCCTGGAAGTGGAGGAGCAGGTGG-3'

15 SEQ ID NO: 18 (cebador inverso de cadena lambda de PCR)

5'-GACTGAATTCCTGGGATCCTGCAGCTC-3'

SEQ ID NO: 19 (cebador inverso de cadena lambda de PCR)

5'-ACTGGAATTCGGGGTGAGGGTTGAGAACC-3'

ES 2 692 173 T3

- SEQ ID NO: 20 (cebador específico del gen directo de HC de RhD1)
5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCC-3'
- SEQ ID NO: 21 (cebador específico del gen directo de HC de RhD2)
5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCC-3'
- 5 SEQ ID NO: 22 (cebador específico del gen directo de HC de RhD3)
5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACACACTTTGCTACACACTCC-3'
- SEQ ID NO: 23 (cebador inverso usado para todas las cadenas pesadas)
5'-TGACGAATTCCA CTCA TTTACCCGGAGACAGG-3'
- SEQ ID NO: 24 (cebador específico del gen directo de LC de RhD1 y RhD2)
10 5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGCCTGGGCTCTGCTATTC-3'
- SEQ ID NO: 25 (cebador inverso de LC de RhD1 y RhD2)
5'-ACTGGAATT CGAACCTATGAACATTCTGTAGGGG-3'
- SEQ ID NO: 26 (cebador específico de gen directo de LC de RhD3)
5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCG-3'
- 15 SEQ ID NO: 27 (cebador inverso de LC de RhD3)
5'-GACTGAATTCC TAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3'
- SEQ ID NO: 28 (cebador directo para la amplificación de la región constante de RhD3)
5'-ATCGTCTAGAGTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC-3'
- SEQ ID NO: 29 (cebador inverso para amplificación de la región constante de RhD3)
20 5'-TGACGAATTCCA CTCA TTTACCCGGAGACAGG-3'
- SEQ ID NO: 30 (cebador directo para la amplificación del dominio variable de RhD1)
5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCC-3'
- SEQ ID NO: 31 (cebador inverso para la amplificación del dominio variable de RhD1)
5'-GATGCTAGCTGAGGAGACGGTGATCGTGG-3'
- 25 SEQ ID NO: 32 (secuencia del inserto de HC de RhD1 para el vector de expresión pCB3)

ES 2 692 173 T3

XbaI Kozak Inicio
 1 TCTAGAGCCA CCATGGACTG GACCTGGAGG TTCCTCTTTG TGGTGGCAGC AGCTACAGGT
 61 GTCCAGTCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC TGGGTCTCCG
 121 GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGAGGC ATCTTCAGAA CCTATGCTAT CAGCTGGGTG
 181 CGACAGGCCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGAGGGA TCATCCCTAT GTTTGGTACA
 241 GTAAACTACG CACAGAAGTT CCAGGGCAGA GTCACGATTA GCGCGGACAA ATCCACGAGC
 301 ACAGCCTATA TGGAAGTGA GAGACTGAGA TCTGAGGACA CGGCCGTGTA TFACTGTGCG
 361 AGGCCGCCTT CCGGGGGTTG TGGTGGTGAC TGCTCACGGA GGGGCTACTA CTACGCCATG
 421 GACGTCTGGG GCCAAGGGAC CACGATCACC GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG
 481 GTCTTCCCC TGGCACCCCT CTCCAAGAGC ACCTCTGGGG GCACAGCGGC CCTGGGCTGC
 541 CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT GGAAGTCAAG CGCCCTGACC
 601 AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCTA CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC
 661 GTGGTGACCG TGCCCTCCAG CAGCTTGGGC ACCCAGACCT ACATCTGCAA CGTGAATCAC
 721 AAGCCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAGAAA GTTGAGCCCA AATCTTGTGA CAAAAGTCAAC
 781 ACATGCCAC CGTGCCACG ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
 841 CCAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG
 901 GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
 961 CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
 1021 GTCCTACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC
 1081 AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA
 1141 GAACCACAGG TGACACCCT GCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC
 1201 CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
 1261 GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTC
 1321 TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA
 1381 TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT
 Detención EcoRI
 1441 CCGGGTAAAT GAGTGAATT C

SEQ ID NO: 33 (secuencia del inserto de LC de RhD1 para el vector de expresión pCB11)

XbaI Kozak Inicio
 1 TCTAGAGCCA CCATGGCCTG GGCTCTGCTA TTCCTCACCC TCCTCACTCA GGGCACAGGG
 61 TCCTGGGCCC AGTCTGCCCT GACTCAACCT GCCTCCGTGT CTGGGTCTCC TGGACAGTCG
 121 ATCACCATCT CCTGCAGTGG AAGCAGCAGT GACGTTGGTG GTTATAAGTA TGTCTCCTGG
 181 TACCAACAAC ACCCAGGCAA AGCCCCCAA CTCATGATTT ATGATGTCAA TAATCGGCC
 241 TCAGGGGTTT CTAATCGCTT CTCTGGCTCC AAGTCTGGCA ACACGGCCTC CCTGACCATC

ES 2 692 173 T3

301 TCTGGGCTCC AGGCTGAGGA CGAGGCTGAT TATTACTGCA GCTCATATAC AAGCAGCAGC
 361 ACTCGAGTGT TCGGCGGAGG GACGAAGCTG ACCGTCCTAG GTCAGCCCAA GGCTGCCCCC
 421 TCGGTCACTC TGTTCCCACC CTCCTCTGAG GAGCTTCAAG CCAACAAGGC CACACTGGTG
 481 TGTCTCATAA GTGACTTCTA CCCGGGAGCC GTGACAGTGG CCTGGAAGGC AGATAGCAGC
 541 CCCGTCAAGG CGGGAGTGGG GACCACCACA CCCTCCAAAC AAAGCAACAA CAAGTACGCG
 601 GCCAGCAGCT ACCTGAGCCT GACGCCTGAG CAGTGGAAAGT CCCACAAAAG CTACAGCTGC
 661 CAGGTCACGC ATGAAGGGAG CACCGTGGAG AAGACAGTGG CCCCTACAGA ATGTTCATAG
 721 GTTCGAATTC

SEQ ID NO: 34 (secuencia del inserto de HC de RhD2 para el vector de expresión pCB3)

XbaI Kozak Inicio
 1 TCTAGAGCCA CCATGGACTG GACCTGGAGG TTCCTCTTTG TGGTGGCAGC AGCTACAGGT
 61 GTCCAGTCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC TGGGTCTCCG
 121 GTGAAGTCT CCTGCAAACC TTCTGGAGGC ATCTTCAGCA CCTATGCTAT CAGCTGGGTG
 181 CGACAGGCCC CGGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGAGGGA TCATCCCTAT GTTTGGGACA
 241 GTAAACTACG CACAGAAGTT CCAGGGCAGA GTCACCATTA GCGCGGGCAA ATCCACGAGC
 301 ACAGCCGATA TGGAAGTGA GAGACTGAGA TCTGAGGACA CGGCCGTGTA TACTGTGCG
 361 AGGCCGCTT CCGGGGGTTG TGGTGGTAC TGCTCACGGA GGGGCTATTA TTATGGTATG
 421 GACGTCTGGG GCCAAGGGAC CACGGTCATC GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG
 481 GTCTTCCCC TGGCACCTC CTCCAAGAGC ACCTCTGGGG GCACAGCGGC CCTGGGCTGC
 541 CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT GGAAGTCAAG CGCCCTGACC
 601 AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCTTA CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC
 661 GTGGTGACCG TGCCCTCCAG CAGCTTGGGC ACCCAGACCT ACATCTGCAA CGTGAATCAC
 721 AAGCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAGAAA GTTGAGCCCA AATCTTGTGA CAAAAGTCAAC
 781 ACATGCCAC CGTGCCACG ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
 841 CAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACATG CGTGGTGGTG
 901 GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
 961 CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
 1021 GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC
 1081 AACAAAGCCC TCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA
 1141 GAACACAGG TGACACCCT GCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTGAGC
 1201 CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
 1261 GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCACG CCTCCCCTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
 1321 TTCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA
 1381 TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT
 1441 CCGGGTAAAT GAGTGGAAAT C

SEQ ID NO: 35 (Secuencia del inserto de LC de RhD2 para el vector de expresión pCB11)

ES 2 692 173 T3

XbaI Kozak Inicio
1 TCTAGAGCCA CCATGGCCTG GGCTCTGCTA TTCCTCACCC TCCTCACTCA GGGCACAGGG
61 TCCTGGGCCC AGTCTGCCCT GACTCAGCCT GCCTCCGTGT CTGGGTCTCC TGGACAGTCG
121 ATCACCATCT CCTGCAGTGG AAGCAGCAGT GACGTTGGTG CTTATAAGTA TGCTCCTGG
181 TACCAACAAC ACCCAGGCAA AACCCCAAA CTCATGATTT ATGATGTCAA TAATCGGCCC
241 TCAGGGGTTT CTGATCGCTT CTCTGGCTCC AAGTCTGGCA ACACGGCCTT TCTGACCATC
301 TCTGGGCTCC AGGCTGAGGA CGAGGCTGAT TATTACTGCA ACTCATATAC AAGCAGCAGC
361 ACTCGAGTGT TCGGCGGAGG GACCAAGCTG ACCGTCCTAG GTCAGCCCAA GGCTGCCCCC
421 TCGGTCACTC TGTTCCACC CTCCTCTGAG GAGCTTCAAG CCAACAAGGC CACACTGGTG
481 TGCTCATAA GTGACTTCTA CCCGGGAGCC GTGACAGTGG CCTGGAAGGC AGATAGCAGC
541 CCCGTCAAGG CGGGAGTGA GACCACCACA CCCTCAAAC AAAGCAACAA CAAGTACGGC
601 GCCAGCAGCT ACCTGAGCCT GACGCCTGAG CAGTGAAGT CCCACAAAAG CTACAGCTGC
661 CAGGTCACGC ATGAAGGGAG CACCGTGGAG AAGACAGTGG CCCCTACAGA ATGTTCATAG
721 GTTCGAATTC
EcoRI

SEQ ID NO: 36 (secuencia del inserto de HC de RhD3 para el vector de expresión pCB3)

XbaI Kozak Inicio
1 TCTAGAGCCA CCATGGACAC ACTTTGCTAC ACACTCCTGC TGCTGACCAC CCCTTCTGG
61 GTCTTGTCCC AGGTCACCTT GAAGGAGTCT GGTCTGTGC TGGTGAAACC CACAGAGACC
121 CTCACGCTGA CCTGCACCGT CTCTGGGTTT TCACTCAACA ATGCTAGAAT GGGTGTGAGC
181 TGGATCCGTC AGCCCCCAGG GAAGGCCCTG GAGTGGCTTG CACACATTTT TTCGAATGAC
241 GAAAAATCCT ACAGCACATC TCTGAAGAGC AGGCTCACCA TCTCCAAGGA CACCTCAAAA
301 AGCCAGGTGT TCCTTACCAT GACCAACATG GACCCTGTGG ACACAGCCAC ATATTACTGT
361 GCACGGACCC CTATTACTAT GGTTCCGGGA GCTATTAGGC TATACTACTA CTACTACATG
421 GACGTCTGGG GCAAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG CTTCCACCAA GGGCCCATCG
481 GTCTTCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCTGGGG GCACAGCGGC CCTGGGCTGC
541 CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT GGAACCTCAGG CGCCCTGACC
601 AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCTA CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC
661 GTGGTGACCG TGCCCTCCAG CAGCTTGGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTGAATCAC
721 AAGCCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAGAGA GTTGAGCTCA AAACCCCACT TGGTGACACA
781 ACTCACACAT GCCCAGGTG CCCAGAGCCC AAATCTTGTG ACACACCTCC CCCGTGCCA
841 CGGTGCCCAG AGCCCAAATC TTGTGACACA CCTCCCCAT GCCCAGGTG CCCAGAGCCC
901 AAATCTTGTG ACACACCTCC CCCATGCCA CGGTGCCCAG CACCTGAACCT CCTGGGAGGA
961 CCGTCAGTCT TCCTTCTCCC CCAAAACCC AAGGATACCC TTATGATTTT CCGGACCCCT
1021 GAGGTCACGT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CCGAGGTCCA GTTCAAGTGG

ES 2 692 173 T3

1081 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCAAC
 1141 AGCACGTTCC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAG
 1201 GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 1261 AAAACCAAAG GACAGCCCCG AGAACACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGAGGAG
 1321 ATGACCAAGA ACCAGGTCAAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTACCC CAGCGACATC
 1381 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAG CGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAACACCAC GCCTCCCATG
 1441 CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG
 1501 CAGCAGGGGA ACATCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCGCTTCACG
 1561 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAG TGAGTGAAT TC

SEQ ID NO: 37 (Secuencia de inserción de LC de RhD3 para el vector de expresión pCB11)

XbaI Kozak Inicio
 1 TCTAGAGCCA CCATGGACAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTACTCTGG
 61 CTCCGAGGTG CCAGATGTGA CATCCAGGTG ACCCAGTCTC CGTCCTCCCT GTCTGCGTCT
 121 GTAGGAGACA GAGTCACCAT CAATTGCCGG GCAAGTCAGA GCATTGGCAC CTATTTAAAT
 181 TGGTATCAGC AGAAACCAGG GAAAGCCCCT AACCTCCTGA TCTATGCTGC ATCCAGTTTG
 241 CAGAGTGGGG TCCCATCAAG GTTCAGTGGC AGTGGATCTG GGACAGATTT CACTCTCACC
 301 ATCAGCAGTC TGCAACCTGA AGATTTTGCA ACTTATTACT GTCAACAGAC TTACAGTACC
 361 CCCACGTGGA CGTTCGGCCG AGGGACCAAG GTGGAAATCA AGCGAACTGT GGCTGCACCA
 421 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG
 481 TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT GGATAACGCC
 541 CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
 601 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA ACTCTACGCC
 661 TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG
 721 TGTTAGGAAT TC

Detención EcoRI

SEQ ID NO: 38 (Secuencia del inserto de HC de RhD1V3C para el vector de expresión pCB3)

XbaI Kozak Inicio
 1 TCTAGAGCCA CCATGGACTG GACCTGGAGG TTCCTCTTTG TGGTGGCAGC AGCTACAGGT
 61 GTCCAGTCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC TGGTCCCTCG
 121 GTGAAGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGAGGC ATCTTCAGAA CCTATGCTAT CAGCTGGGTG
 181 CGACAGGCCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGAGGGA TCATCCCTAT GTTTGGTACA
 241 GTAAACTACG CACAGAAGTT CCAGGGCAGA GTCACGATTA GCGCGGACAA ATCCACGAGC
 301 ACAGCCTATA TGGAAGTGA CAGACTGAGA TCTGAGGACA CGGCCGTGTA TTAAGTGTGG
 361 AGGCCGCTT CCGGGGGTTG TGGTGGTAC TGCTCACGGA GGGGCTACTA CTACGCCATG
 421 GACGCTGGG GCCAAGGGAC CACGATCACC GTCTCCTCAG CTAGCACCAA GGGCCCATCG

NheI

ES 2 692 173 T3

481 GTCTTCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCTGGGG GCACAGCGGC CCTGGGCTGC
 541 CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT GGAACTCAGG CGCCCTGACC
 601 AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCTA CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC
 661 GTGGTGACCG TGCCCTCCAG CAGCTTGGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTGAATCAC
 721 AAGCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAGAGA GTTGAGCTCA AAACCCACT TGGTGACACA
 781 ACTCACACAT GCCACGGTG CCCAGAGCCC AAATCTTGTG ACACACCTCC CCCGTGCCCA
 841 CGGTGCCAG AGCCCAAATC TTGTGACACA CCTCCCCAT GCCCAGGTG CCCAGAGCCC
 901 AAATCTTGTG ACACACCTCC CCCATGCCCA CGGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGAGGA
 961 CCGTCAGTCT TCCTTCTCCC CCCAAAACCC AAGGATACCC TTATGATTC CCGGACCCCT
 1021 GAGGTCACGT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CCGAGGTCCA GTTCAAGTGG
 1081 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCAAC
 1141 AGCACGTTCC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAG
 1201 GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 1261 AAAACCAAAG GACAGCCCCG AGAACACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGAGGAG
 1321 ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTACCC CAGCGACATC
 1381 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAG CGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAACACCAC GCCTCCCATG
 1441 CTGGAATCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG
 1501 CAGCAGGGGA ACATCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCGTTCACG
 1561 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGAGTGAAT TC
 Detención EcoRI

SEQ ID NO: 39 (Secuencia de nucleótidos de la región codificante optimizada de HC de RhD1)

BamHI Kozak Inicio
 1 GGATCCGCCA CCATGGACTG GACCTGGCGC TTCCTGTTTCG TGGTGGCCGC CGCCACCGGC
 61 GTGCAGAGCC AGGTGCAGCT GGTGCAGAGC GGCGCCGAGG TGAAGAAGCC CGGCAGCAGC
 121 GTCAAGGTGT CCTGCAAGGC CAGCGGCGGC ATCTTCCGCA CCTACGCCAT CTCTTGGGTC
 181 CGGCAGGCTC CCGGCAGGG GCTCGAGTGG ATGGGCGGCA TCATCCCAT GTTCGGCACC
 241 GTGAAGTACG CCCAGAAGTT CCAGGGCCGC GTCACCATCA GCGCCGACAA GAGCACCAGC
 301 ACCGCCTACA TGGAGCTGTC CCGCCTGCGC TCCGAGGACA CCGCCGTGTA CTAAGTGTCT
 361 AGGCCTCCCA GCGGCGGCTG CGGCAGGAC TGCAGCCGCA GGGGCTACTA CTACGCTATG
 421 GACGTGTGGG GCCAGGGCAC CACCATCACC GTGAGCAGCG CTAGACCAA GGGCCCCAGC
 481 GTGTTCCCC TGGCCCCAG CAGCAAGAGC ACCTCCGGCG GCACCGCCGC CCTGGGCTGC
 541 CTGGTGAAGG ACTACTTCCC CGAGCCCGTG ACCGTGAGCT GGAACAGCGG CGCCCTGACC
 601 AGCGGCGTGC ACACCTTCCC CGCCGTGCTG CAGAGCAGCG GCCTGTACAG CCTGAGCAGC
 661 GTGGTGACCG TGCCAGCAG CAGCCTGGGC ACCCAGACCT ACATCTGCAA CGTGAACCAC
 721 AAGCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAGAAG GTGGAGCCCA AGAGCTGCGA CAAGACCCAC
 781 ACCTGCCCCC CCTGCCCGC CCCCAGCTG CTGGGCGGCC CCTCCGTGTT CCTGTTCCCC
 841 CCCAAGCCCA AGGACACCCT GATGATCAGC CGCACCCCG AGGTGACCTG CGTGGTGGTG
 901 GACGTGAGCC ACGAGGACCC CGAGGTGAAG TCAACTGGT ACGTGGACCG CGTGGAGGTG
 961 CACAACGCCA AGACCAAGCC CCGCGAGGAG CAGTACAACA GCACCTACCG CGTGGTGTCC
 1021 GTGCTGACCG TGCTGCACCA GAAGTGGCTG AACGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC
 1081 AACAAAGGCC TGCCCGCCCC CATCGAGAAG ACCATCAGCA AGGCCAAGGG GCAGCCTAGA
 1141 GAGCCCCAGG TCTACACCCT GCCTCCATCC CGCGACGAGC TGACCAAGAA CCAGGTGTCC
 1201 CTGACCTGTC TGGTCAAGGG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAC
 1261 GGCCAGCCCG AGAACAACTA CAAGACCACC CCCCCGTGC TGGACAGCGA CGGCAGCTTC
 1321 TTCCTGTACA GCAAGCTGAC CGTGGACAAG AGCCGCTGGC AGCAGGGCAA CGTGTTCAGC
 1381 TGCAGCGTGA TGCACGAGGC CCTGCACAAC CACTACACCC AGAAGAGCCT GAGCCTGTCC
 1441 Detención NotI
 CCCGGCAAGT GATGAGCGGC CGC

SEQ ID NO: 40 (Secuencia de nucleótidos de la región de codificación optimizada de LC de RhD1)

BamHI Kozak Inicio
 1 GGATCCGCCA CCATGGCCTG GGCCCTGCTG TTCCTGACCC TGCTGACCCA GGGCACC^{GGC}
 61 AGCTGGGCCC AGAGCGCCCT GACCCAGCCC GCCAGCCTGA GCGGCAGCCC CGGCCAGTCT
 121 ATCACCATCT CTTGTAGCGG CAGCAGCAGC GACGTGGGCG GCTACAAGTA CGTGTCTTGG
 181 TATCAGCAGC ACCCCGGCAA GGCCCCCGAG CTGATGATCT ACGACGTGAA CAACCGCCCC
 241 AGCGGCGTGA GCAACCGCTT CAGCGGCTCC AAGAGCGGCA ACACCGCCAG CCTGACCATC
 301 TCTGGGCTGC AGGCTGAGGA CGAGGCCGAC TACTACTGCA GCAGCTACAC CAGCAGCTCC
 361 ACCCGCGTGT TCGGCGGCGG CACCAAGCTG ACCGTGCTGG GCCAGCCCAA GGCCGCCCCC
 421 AGCGTGACCC TGTTCCCCC CAGCAGCGAG GAGCTCCAGG CCAACAAGGC TACCCTGGTG
 481 TGCCTGATCA GCGACTTCTA CCCC^{GGCGCC} GTGACCGTCC CCTGGAAGGC CGACAGCAGC
 541 CCCGTGAAGG CCGGCGTGGG GACCAACC ACCAGCAAGC AGAGCAACAA CAAGTACGCC
 601 GCCAGCAGCT ACCTGAGCCT GACCCCGAG CAGTGAAGA GCCACAAGAG CTACAGCTGC
 Detención
 661 CAGGTGACCC ACGAGGGCAG CACCGTGGAG AAGACCGTGG CCCCACCGA GTGCAGCTGA
 NotI
 721 TGAGCGGCCG C

SEQ ID NO: 41 (Secuencia de nucleótidos de la región de codificación optimizada de HC de RhD3)

BamHI Kozak Inicio
 1 GGATCCGCCA CCATGGACAC CCTGTGCTAC ACCCTGCTGC TGCTGACCAC CCCCAGCTGG
 61 GTGCTGTCCC AGGTGACCCT GAAGGAGAGC GGCCCTGTCC TGGTGAAGCC CACCGAGACC
 121 CTGACCCTGA CCTGCACCGT GAGCGCTTC AGCCTGAACA ACGCCCGCAT GGGCGTGAGC
 181 TGGATCAGGC AGCCCCCTGG CAAGGCCCTG GAGTGGCTGG CCCACATCTT CAGCAAGCAG
 241 GAGAAGAGCT ACAGACCAG CCGTAAGAGC CGCCTGACCA TCAGCAAGGA CACCGACAAG
 301 AGCCAGGTGT TCCTGACCAT GACCAACATG GACCCCGTGG ACACCGCCAC CTA^{CTACTG}C
 361 GCCCGCACCC CCATCACAAT GGTGAGAGGC GCCATCCGCC TGTA^{CTACTA}CTATTACATG
 421 GACGTGTGGG GCAAGGGCAC CACCGTGACC GTGAGCAGCG CTAGCACCAA GGGCCCCCAGC
 481 GTGTTCCCCC TGGCCCCCTG CAGCCGACG ACCTCTGGCG GCACCGCCGC TCTGGGCTGC
 541 CTGGTGAAGG ACTACTTCCC CGAGCCTGTG ACCGTGTCTT GGA^{ACTCTG}G CGCCCTGACC
 601 AGCGGCGTGC ACACCTTCCC CGCCGTGCTG CAGAGCAGCG GCCTGTACAG CCTGAGCAGC
 661 GTGGTGACCG TGCCCAGCAG CAGCCTGGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTGAACCAC
 721 AAGCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAGCGC GTGGAGCTGA AGACCCCCCT GGGCGACACC
 781 ACCACACCT GCCCAGATG TCCCGAGCCC AAGAGCTGG ACACCCCCC TCCCTGCCCT
 841 CGCTGCCCTG AGCCTAAGTC CTGTGACACC CCTCCCCCTT GCCCCCGGTG TCCAGAGCCA
 901 AAGTCTTGGC ATACCCACC CCCCTGTCCA AGGTGCCCTG CCCCAGACT GCTGGGCGGA
 961 CCCTCCGTGT TCCTGTTCCC CCCAAGCCC AAGGACACC TGATGATCAG CCGCACCCCC
 1021 GAGGTGACCT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAGGACC CCGAGGTGCA GTTCAAGTGG
 1081 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCACAACGCC AAGACCAAGC CCCGCGAGGA GCAGTTTAA
 1141 AGCACCTTCC GCGTGGTGTG TGTGCTGACC GTGCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAG
 1201 GAATACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAGGCC CTGCCTGCC CCATCGAGAA GACCATCTCT
 1261 AAGACCAAGG GCCAGCCTCG CGAGCCCCAG GTGTACACC TGCCCCCAG CCGCGAGGAG
 1321 ATGACCAAGA ACCAGGTGC CTCACCTGC CTCGTGAAGG GCTTCTACC CAGCGACATC
 1381 GCCGTGGAGT GGGAGTCCAG CGGCCAGCCC GAGAACA^{ACT} ACAACACCAC CCCCCCATG
 1441 CTGGACAGCG ACGGCAGCTT CTTCTGTAC AGCAAGCTGA CCGTGGACAA GAGCCGCTGG
 1501 CAGCAGGGCA ACATCTTCTC TTGCAGCGTG ATGCACGAGG CCCTGCACAA CCGCTTACC
 Detención NotI
 1561 CAGAAGAGCC TGAGCCTGTC CCCC^{GGCAAG} TAATGAGCGG CCGC

SEQ ID NO: 42 (Secuencia de nucleótidos de la región de codificación optimizada de LC de RhD3)

BamHI Kozak Inicio
 1 GGATCCGCCA CCATGGACAT GCGCGTGCCC GCCAGCTGC TGGGCTGCT GCTGCTGTGG
 61 CTGAGGGGCG CCCGCTGCGA CATCCAGGTG ACCCAGAGCC CCAGCAGCCT GAGCGCCAGC
 121 GTGGGCGACC GCGTGACCAT CAACTGCCCG GCCAGCCAGA GCATCGGCAC CTACCTGAAC
 181 TGTATCAGC AGAAGCCCGG CAAGCCCCC AACCTGCTGA TCTACGCCG CAGTCCCTG
 241 CAGAGCGGCG TGCCAGCCG CTTCAGCGGC AGCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
 301 ATCAGCAGCC TGACGCCGA GACTTCGCC ACCTACTACT GCCAGCAGAC CTACAGCACC
 361 CCCACCTGGA CTTTCGGCAG GGGCACC^{AAG} GTGGAGATCA AGCGCACCGT GGCCGCCCCC
 421 AGCGTGTTC TTTCCCCC CAGCGACGAG CAGCTGAAGA GCGGCACCGC TAGCGTGGTG
 481 TGCTGTCTGA ACAACTTCTA CCCC^{CGCGAG} GCCAAAGTGC AGTGAAGGT GGACAACGCC
 541 CTGCAGTCCG GCAACAGCCA GGAGACGTC ACCGACGAGG ACAGCAAGGA CTCCACCTAC
 601 AGCCTGAGCA GCACCTGAC CTTGAGCAAG GCCGACTAC AGAAGC^{ACAA} GCTGTACGCC
 661 TGCGAGGTGA CCCACCAGGG CCGTCCAGC CCGTGACCA AGAGCTTCAA CCGCGGCGAG
 Detención NotI
 721 TGCTGATGAG CGGCCG

5

SEQ ID NO: 43 (Cebador directo optimizado de HC de RhD1)

5'-ATCG TCTAGA GCCACCATGGACTGGACCTG-3'

SEQ ID NO: 44 (Cebador inverso optimizado de HC de RhD1)

10 5'-ATCG GGATCC TCATCACTTGCCGGGGGAC-3'

ES 2 692 173 T3

SEQ ID NO: 45 (Cebador directo optimizado de LC de RhD1)

5'-ATCG TCTAGA GCCACCATGGCCTGGGCC-3'

SEQ ID NO 46 (Cebador inverso optimizado de LC de RhD1)

5'-ATCG GGATCC TCATCAGCTGCACTCGGTGGGG-3'

5 SEQ ID NO: 47 (Secuencia de la HC optimizada de RhD1 para inserción en el vector pCB3)

XbaI Kozak Inicio

1 TCTAGAGCCA CCATGGACTG GACCTGGCGC TTCCTGTTTCG TGGTGGCCGC CGCCACCGGC

61 GTGCAGAGCC AGGTGCAGCT GGTGCAGAGC GGCGCCGAGG TGAAGAAGCC CGGCAGCAGC

121 GTCAAGGTGT CCTGCAAGGC CAGCGGCGGC ATCTTCCGCA CCTACGCCAT CTCTGGGTC

181 CGGCAGGCTC CCGGGCAGGG GCTCGAGTGG ATGGGCGGCA TCATCCCAT GTTCGGCACC

241 GTGAACTACG CCCAGAAGTT CCAGGGCCGC GTCACCATCA GCGCCGACAA GAGCACCAGC

301 ACCGCCTACA TGGAGCTGC CCGCCTGCGC TCCGAGGACA CCGCCGTGTA CTA CTGTGCT

361 AGGCCTCCCA GCGGCGGCTG CCGCGGCGAC TGCAGCCGCA GGGGCTACTA CTACGCTATG

421 GACGTGTGGG GCCAGGGCAC CACCATCACC GTGAGCAGCG CTAGCACAA GGCAGCCAGC

481 GTGTTCCCCC TGGCCCCCAG CAGCAAGAGC ACCTCCGGCG GCACCGCCGC CCTGGGCTGC

541 CTGGTGAAGG ACTACTTCCC CGAGCCCGTG ACCGTGAGCT GGAACAGCGG CGCCCTGACC

601 AGCGGCTGC ACACCTTCCC CGCCGTGCTG CAGAGCAGCG GCCTGTACAG CCTGAGCAGC

661 GTGGTGACCG TGCCCAGCAG CAGCCTGGGC ACCCAGACCT ACATCTGCAA CGTGAACCAC

721 AAGCCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAGAAG GTGGAGCCA AGAGCTCCGA CAAGACCCAC

781 ACCTGCCCCC CCTGCCCGC CCCCAGCTG CTGGGCGGCC CCTCCGTGTT CCTGTTCCCC

841 CCCAAGCCCA AGGACACCCT GATGATCAGC CGCACCCCCG AGGTGACCTG CGTGGTGGTG

901 GACGTGAGCC ACGAGGACCC CGAGGTGAAG TCAACTGGT ACGTGGACCG CGTGGAGGTG

961 CACAACGCCA AGACCAAGCC CCGCGAGGAG CAGTACAACA GCACCTACCG CGTGGTGTCC

1021 GTGCTGACCG TGCTGCACCA GACTGCGTGC AACGGCAAGG AGTACAAGT CAAGGTCTCC

1081 AACAAGGCC TGCCCGCCCC CATCGAGAAG ACCATCAGCA AGGCCAAGGG GCAGCCTAGA

1141 GAGCCCAGG TCTACACCCT GCCTCCATCC CGCGACGAGC TGACCAAGAA CCAGGTGTCC

1201 CTGACCTGTC TGGTCAAGGG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAC

1261 GGCCAGCCCC AGAACAATA CAAGACCACC CCCCCGTGC TGGACAGCGA CGGCAGCTTC

1321 TTCTGTACA GCAAGCTGAC CGTGGACAAG AGCCGCTGGC AGCAGGGCAA CGTGTTCAGC

1381 TGCAGCGTGA TGCACGAGGC CTGCACAAC CACTACACC AGAAGAGCCT GAGCCTGTCC

Detención BamHI

1441 CCCGCAAGT GATGAGGATCC

SEQ ID NO: 48 (Secuencia de la LC optimizada de RhD1 para inserción en el vector pCB11)

XbaI Kozak Inicio

1 TCTAGAGCCA CCATGGCCTG GGCCCTGCTG TTCCTGACCC TGCTGACCCA GGGCACCGGC

61 AGCTGGGCCC AGAGCGCCCT GACCCAGCCC GCCAGCGTGA GCGGCAGCCC CGGCCAGTCT

121 ATCACCATCT CTTGTAGCGG CAGCAGCAGC GACGTGGGCG GCTACAAGTA CGTGTCTTGG

181 TATCAGCAGC ACCCCGGCAA GGCCCCCAG CTGATGATCT ACGACGTGAA CAACCGCCCC

241 AGCGCGTGA GCAACCGCTT CAGCGGCTCC AAGAGCGGCA ACACCGCCAG CCTGACCATC

301 TCTGGGCTGC AGGCTGAGGA CGAGGCCGAC TACTACTGCA GCAGCTACAC CAGCAGCTCC

361 ACCCGCGTGT TCGGCGGCGG CACCAAGCTG ACCGTGCTGG GCCAGCCCAA GGCCGCCCCC

421 AGCGTGACCC TGTTCCCCC CAGCAGCGAG GAGCTCCAGG CCAACAAGGC TACCTGGTG

481 TGCTGATCA GCGACTTCTA CCCCAGCGCC GTGACCGTCG CCTGGAAGGC CGACAGCAGC

541 CCCGTGAAGG CCGGCGTGA GACCACCACC CCCAGCAAGC AGAGCAACAA CAAGTACGCC

601 GCCAGCAGCT ACCTGAGCCT GACCCCGAG CAGTGAAGA GCCACAAGAG CTACAGCTGC

Detención BamHI

661 CAGGTGACCC ACGAGGGCAG CACCGTGGAG AAGACCGTGG CCCCACCGA GTGCAGCTGA

BamHI

721 TGAGGATCC

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-RhD aislado que comprende:
- 5 una región variable de cadena pesada que es al menos un 80% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 2 y tiene una primera, segunda y tercera CDR que son idénticas a las respectivas primera, segunda y tercera CDR de la SEQ ID NO: 2, y
- una región variable de cadena ligera que es al menos 80% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 4 y tiene una primera, segunda y tercera CDR que son idénticas a las respectivas primera, segunda y tercera CDR de la SEQ ID NO: 4;
- en el que las CDR del anticuerpo monoclonal se determinan usando la herramienta IMGT/V-QUEST.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región variable de la cadena pesada es al menos el 90% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 2 y la región variable de la cadena ligera es al menos el 90% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 4.
3. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo comprende un dominio constante de cadena ligera y un dominio constante de cadena pesada.
- 15 4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada.
5. El anticuerpo de la reivindicación 3 o 4, en el que dicho dominio o región constante de cadena pesada es un dominio o región constante de IgG 1 o IgG 3.
6. Un polinucleótido aislado que codifica la cadena ligera y pesada de un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
- 20 7. Un vector de expresión que incluye secuencias de codificación que codifican las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Un sistema de expresión que incluye secuencias codificantes que codifican las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el sistema de expresión:
- un primer vector de expresión que incluye la secuencia de codificación que codifica la cadena ligera; y
- 25 un segundo vector de expresión que incluye la secuencia de codificación que codifica la cadena pesada.
9. Una célula transformada con un vector o sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
10. Un método para fabricar anticuerpos monoclonales, que comprende cultivar células recombinantes de acuerdo con la reivindicación 9, y recuperar el anticuerpo monoclonal del medio de cultivo.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que la composición farmacéutica comprende un primer anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un segundo anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho primer y segundo anticuerpos monoclonales son distintos entre sí.
- 35 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que el primer anticuerpo monoclonal tiene una cadena pesada que comprende un dominio o región constante de IgG 1, y el segundo anticuerpo monoclonal tiene una cadena pesada que comprende un dominio o región constante de IgG 3.
- 40 14. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para uso en un método para inhibir o prevenir la inmunización de un paciente humano RhD negativo contra sangre RhD positiva.
15. Uso de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la fabricación de un medicamento para inhibir o prevenir la inmunización de un paciente humano RhD negativo contra sangre RhD positiva.

Figura 2

LC de RhD1 ---MAWALLFLTLTQGTGSWA QSALTQ-PASVSGSPGQSITISCSGS SSDVGGYKY VSW 56
 LC de RhD2 ---MAWALLFLTLTQGTGSWA QSALTQ-PASVSGSPGQSITISCSGS SSDVGAYKY VSW 56
 LC de RhD3 MDMRVPQAQLLGLLLWLRGARC DIQVTQSPSSLSASVGDVRTINCRAS QS-IG--TY LNW 57
 . * * : * * * : . : : ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

LC de RhD1 YQQHPGKAPQLMIY DVN NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSS 116
 LC de RhD2 YQQHPGKTPKLMY DVN NRPSGVSDRFSGSKSGNTAFLTISGLQAEDEADYYC NSYTSSS 116
 LC de RhD3 YQQKPGKAPNLLIY AAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLPEDFATYYC QQTVSTP 117
 ::***:*** .. . ***..***** ** . ****.*** ** * *** .. *:.

LC de RhD1 TRV FGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS 176
 LC de RhD2 TRV FGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS 176
 LC de RhD3 TWT FGRGTVKVEIK -RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA 176
 * . ** *** : : . ***** :****.***:.....***:..*** ..* **..*

LC de RhD1 PVKAG-VETTTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG--STVEKTVAPTE 233
 LC de RhD2 PVKAG-VETTTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG--STVEKTVAPTE 233
 LC de RhD3 LQSGNSQESVTEQSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE 236
 ... *:. **: ** *:* : : :.*** *:*:***:* *.* *:. *

LC de RhD1 CS 235
 LC de RhD2 CS 235
 LC de RhD3 C- 237
 *

Figura 3

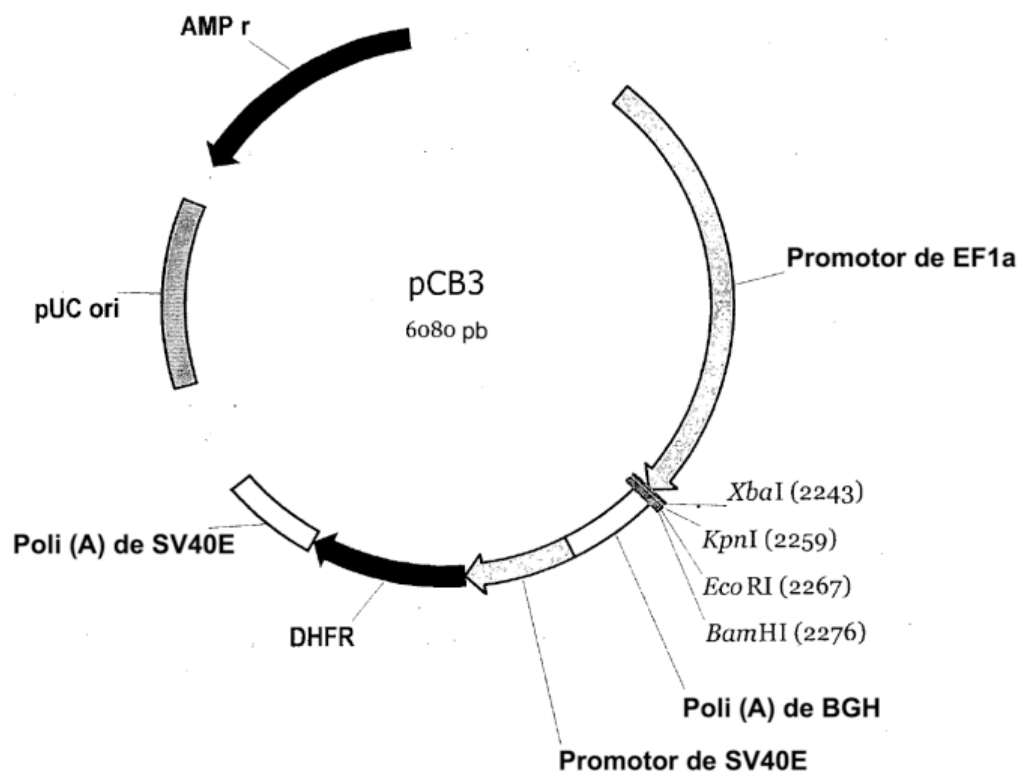


Figura 4

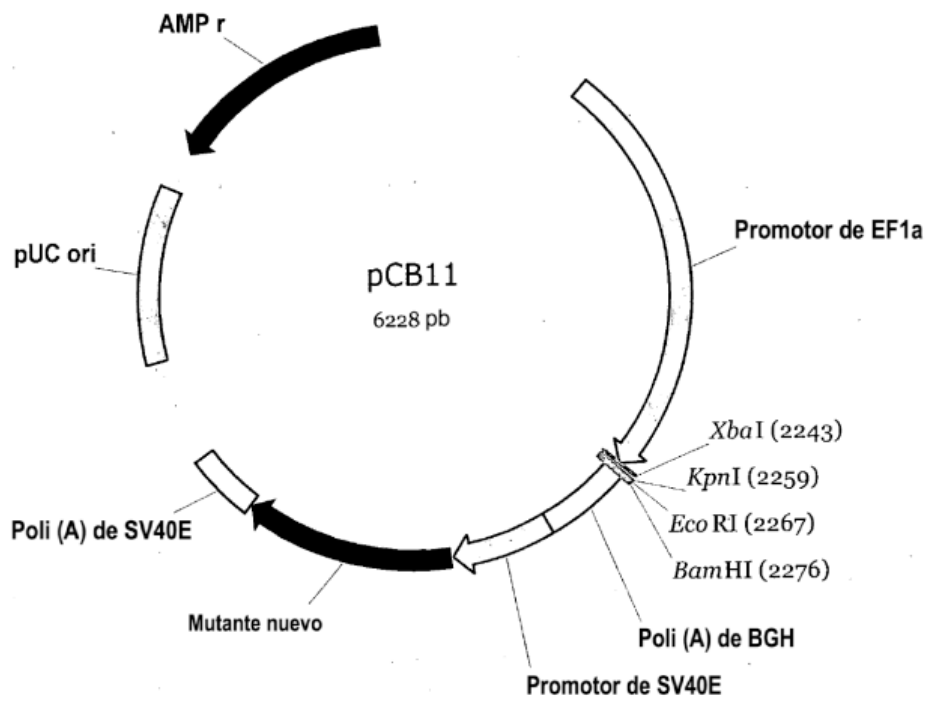


Figura 5

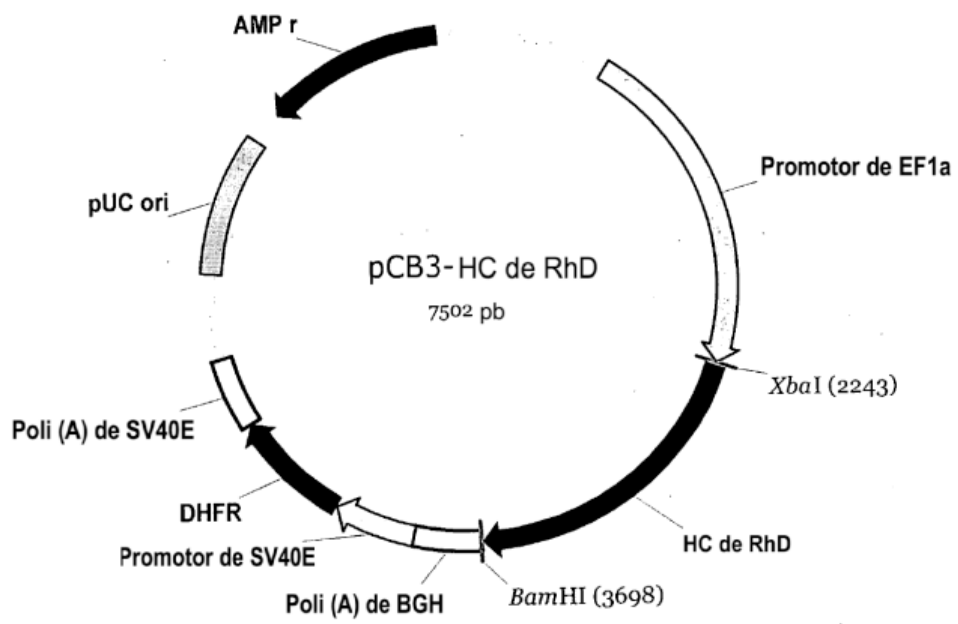


Figura 6

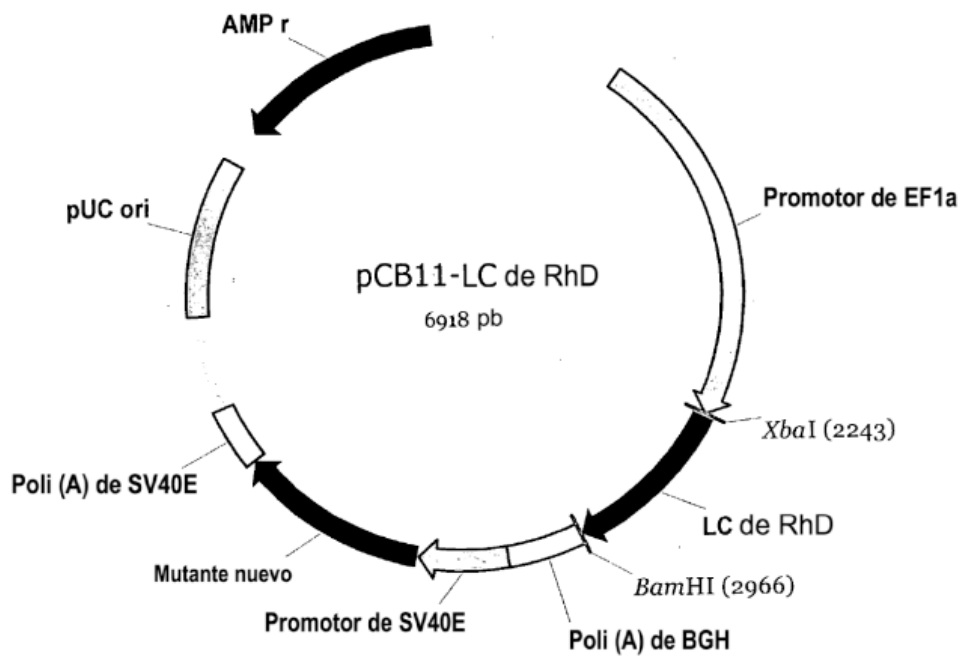


Figura 7

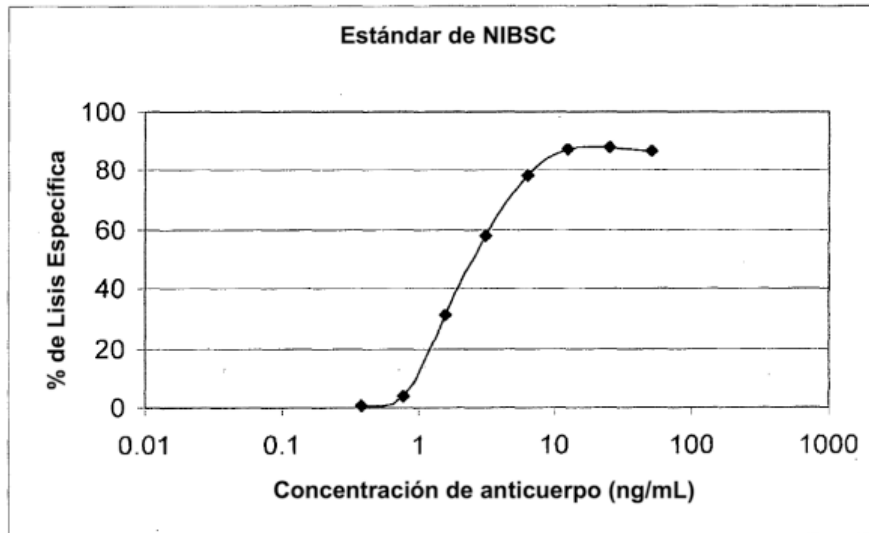


Figura 8

