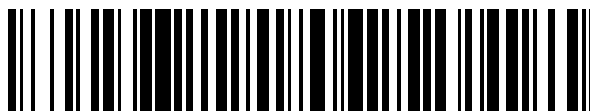


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 854**

51 Int. Cl.:

|                   |                             |           |
|-------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>A61K 39/00</b> | (2006.01) <b>A61P 27/14</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 1/04</b>  | (2006.01) <b>A61P 29/00</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 1/16</b>  | (2006.01) <b>A61P 31/00</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 3/10</b>  | (2006.01) <b>A61P 31/04</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 11/02</b> | (2006.01) <b>A61P 31/14</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 25/00</b> | (2006.01) <b>A61P 31/16</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 25/04</b> | (2006.01) <b>A61P 35/00</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 25/14</b> | (2006.01) <b>C07K 16/18</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 25/16</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 25/28</b> | (2006.01)                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2014 PCT/JP2014/052758**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14123186**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2014 E 14749177 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2955195**

54 Título: **Anticuerpo anti-semaforina 3A y tratamiento de enfermedad de Alzheimer y enfermedades inmunitarias inflamatorias usando el mismo**

30 Prioridad:

**06.02.2013 JP 2013021309**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.10.2019**

73 Titular/es:

**YOKOHAMA CITY UNIVERSITY (50.0%)  
22-2, Seto, Kanazawa-ku Yokohama-shi  
Kanagawa 236-0027, JP y  
CHIOME BIOSCIENCE INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GOSHIMA, YOSHIO;  
NAKAMURA, FUMIO;  
YAMASHITA, NAOYA;  
SEO, HIDETAKA;  
HASHIMOTO, SHUICHI;  
MURAKAMI, KOJI;  
TAKAHASHI, NAOKI y  
SASAKURA, YUKIE**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

**Observaciones:**

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

ES 2 728 854 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-semaforina 3A y tratamiento de enfermedad de Alzheimer y enfermedades inmunitarias inflamatorias usando el mismo

### Campo técnico

La presente invención se refiere un anticuerpo anti-semaforina 3A o a su fragmento de anticuerpo eficaz para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades que implican proteína semaforina 3A. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo. Además, la presente invención se refiere a un método para medir proteína semaforina 3A usando anticuerpo anti-semaforina 3A o su fragmento de anticuerpo.

### Técnica anterior

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la forma más común de demencia (pérdida de memoria) en las personas ancianas. Los agentes terapéuticos actualmente usados para la enfermedad de Alzheimer tienen cualquier mecanismo de acción que permite mejorar la neurotransmisión colinérgica en el sistema nervioso central con un inhibidor de colinesterasa o suprimir la excitotoxicidad con un inhibidor de receptor de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), sin embargo, todos los agentes proporcionan únicamente una mejora leve de los síntomas relacionados. Se ha esperado que se desarrolle un método de tratamiento radical que suprima o mejore la progresión de la neurodegeneración responsable de la enfermedad de Alzheimer.

El principal daño patológico de AD, que se encuentra en el cerebro, está provocado por depósitos extracelulares de proteína amiloide  $\beta$  en formas de placas y coágulos vasculares, y el ovillo neurofibrilar intracelular de proteína  $\tau$  que está agrupada e hiperfosforilada. Evidencias recientes demuestran que aparece un nivel aumentado de amiloide  $\beta$  en el cerebro antes que cambios patológicos de proteína  $\tau$  y se correlaciona con el deterioro cognitivo. Recientes estudios también sugieren que se atribuye el amiloide  $\beta$  como la etiología de AD y revelan que amiloide  $\beta$  agrupado tiene toxicidad frente a neuronas en cultivo celular.

La proteína amiloide  $\beta$  está compuesta principalmente por péptidos de 39 a 42 aminoácidos de longitud y se produce a partir de un precursor de proteína grande denominado proteína precursora de amiloide (APP) mediante acción consecutiva acción de proteasa y  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas. Casos de AD poco frecuentes pero de inicio temprano se atribuyen a una mutación genética de APP que provoca la sobreproducción de una cualquiera de proteína amiloide  $\beta$  total e isoformas de la misma. Los individuos con síndrome de Down tienen un cromosoma adicional que contiene un gen que codifica para APP y tienen un nivel aumentado de amiloide  $\beta$  y con la edad desarrollan AD de manera inevitable.

Las semaforinas son proteínas endógenas identificadas como factores que permiten degenerar el cono de crecimiento neuronal y suprimir la elongación de axones. Los genes de semaforina se clasifican en ocho subfamilias y clases de genes basándose en sus estructuras y se conoce anteriormente que tienen aproximadamente 20 especies moleculares (documento no de patente 1). Sin embargo, se sabe poco sobre las funciones principales de la mayoría de las familias de semaforina. La estudiada con mayor frecuencia es una agrupación de genes de subfamilia denominada clase III y, entre ellas, la estudiada con mayor frecuencia es la semaforina 3A (Sema 3A) (documentos no de patente 2 y 3). Se sabe que la proteína Sema 3A induce la degeneración de conos de crecimiento en células nerviosas en cultivo e inhibe la regeneración y elongación de nervios a un nivel bajo de 10 pM dentro de un plazo de tiempo breve.

En los últimos años, se ha notificado una investigación de que las células dendríticas detectan proteína Sema 3A, posteriormente entran en un canal linfático y se transfieren al interior de un ganglio linfático, lo que sugiere que la proteína Sema 3A está implicada en la enfermedad autoinmunitaria (véase, por ejemplo, el documento no de patente 4), y otra investigación ha revelado que señales mediadas por la proteína Sema 3A y su receptor, plexina-A4, tienen un papel importante en la aparición de septicemia (véase, por ejemplo, el documento no de patente 6), y a partir de estos hallazgos, también se sabe que la proteína Sema 3A está profundamente implicada en formaciones de estados patológicos de enfermedades inmunitarias e infecciosas, etc. Adicionalmente, otras investigaciones han notificado que la proteína Sema 3A se secreta por tejidos y células cancerosas y bloquea una ruta de señal de proteína cinasa activada por mitógeno (MAP) para suprimir la activación de células T, y que pacientes con cáncer de páncreas con un alto nivel de expresión de Sema 3A en el tejido canceroso tienen un mal desenlace, revelando que la proteína Sema 3A también está implicada en la alteración maligna de cáncer (véanse, por ejemplo, los documentos no de patente 5 y 7).

La coagulación intravascular diseminada (DIC) es un estado patológico grave en el que se activa significativamente la coagulación de una manera sistémica y persistente junto con enfermedad subyacente deteriorada. Se sabe que los síntomas principales de DIC son episodios de hemorragias y trastornos de órganos y la aparición de estos síntomas clínicos conduce a un desenlace extremadamente malo. Los ejemplos de enfermedades subyacentes que

inducen DIC incluyen septicemia, leucemia aguda, cáncer sólido, separación prematura de placenta implantada de manera normal, embolia de líquido amniótico, traumatismo, lesión por quemadura, enfermedad de tejido conjuntivo, choque, aneurisma aórtico, hepatitis fulminante, cirrosis hepática, pancreatitis aguda, rabdomiólisis, trombosis, enfermedad infecciosa grave, etc., sin embargo, no queda clara una relación de las enfermedades y Sema 3A.

Anteriormente también se ha notificado un anticuerpo frente a proteína Sema 3A. Por ejemplo, se han notificado investigaciones de que un inhibidor de actividad de proteína Sema 3A tal como un anticuerpo anti-Sema 3A es eficaz para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (véase el documento de patente 1), y también eficaz para el tratamiento de enfermedad inmunitaria y enfermedad inflamatoria (véase el documento de patente 2). Sin embargo, cuando se previene y/o se trata una enfermedad que implica proteína Sema 3A con anticuerpo anti-Sema 3A, no se conoce una estructura de anticuerpo anti-Sema 3A usada con el fin de lograr eficazmente la alta eficacia farmacológica.

Shirvan *et al.* (J Biol Chem, 2002, 277(51): 49799-807) describen que anticuerpos anti-semaforina 3A rescatan células de ganglio retiniano de muerte celular tras axotomía de nervio óptico.

Lepelletier *et al.* (Eur J Immun, 2006, 36(7): 1782-93) describen que el papel inmunosupresor de semaforina-3A sobre la proliferación de células T está mediado por la inhibición de la reorganización en el citoesqueleto de actina.

Wen *et al.* (J Exp Med, 2010, 207(13): 2943-57) describen que se requiere señalización de plexina-A4-semaforina 3A para la tormenta de citocinas inducida por septicemia y receptor de tipo Toll.

El documento US 20120251539 A1 se refiere a un método de tratamiento de un trastorno relacionado con el sistema inmunitario en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de la actividad de plexina-A4 tal como anticuerpos frente a plexina-A4 y proteínas de fusión de plexina-A4, o una cantidad eficaz de un inhibidor de la actividad de semaforina-3A (Sema3A) tal como anticuerpos frente a Sema3A y proteínas de fusión de Sema3A.

El documento EP 2497498 A1 se refiere a un agente terapéutico para tratar una enfermedad inmunitaria celular, que comprende como principio activo una sustancia que inhibe la unión entre Sema3A y un heterorreceptor de neuropilina-1/plexina-A1, tal como un anticuerpo neutralizante de Sema3A, un anticuerpo neutralizante de neuropilina-1 o una neuropilina-1 soluble o derivado de la misma.

Tal como se describió anteriormente, se sabe que la proteína Sema 3A está implicada en diversos estados patológicos y una técnica para medir proteína Sema 3A de una manera altamente precisa es esencial para esclarecer los estados patológicos y desarrollar un agente terapéutico para los estados.

#### Documentos de la técnica anterior

##### Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Cell, 97, 551, 1999

Documento no de patente 2: Cell, 75, 217, 1993

Documento no de patente 3: Cell, 75, 1389, 1993

Documento no de patente 4: Nature Immunology 11, 594-600, 2010

Documento no de patente 5: Blood 107, 3321-3329, 2006

Documento no de patente 6: Journal of Experimental Medicine 207, 2943, 2010

Documento no de patente 7: International Journal of Cancer 121, 2421-2433, 2007

##### Documentos de patente

Documento de patente 1: documento WO 03/007803

Documento de patente 2: documento WO 2011/066284

#### Sumario de la invención

##### Problemas que van a resolverse por la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo frente a proteína Sema 3A en el que el

anticuerpo pueda prevenir y/o tratar eficazmente enfermedades que implican proteína Sema 3A tales como enfermedad neurodegenerativa, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, cáncer, enfermedad infecciosa, etc. y síndrome de coagulación intravascular diseminada. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica capaz de profilaxis y/o tratamiento de enfermedades que implican proteína Sema 3A así como la mejora de síntomas asociados con tales enfermedades. Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo frente a Sema 3A eficaz para medir proteína Sema 3A y un método para medir proteína Sema 3A usando dicho anticuerpo.

#### Medios para resolver el problema

Los presentes inventores han estudiado intensamente para resolver los problemas anteriormente mencionados, y en consecuencia han encontrado que un anticuerpo anti-Sema 3A que contiene una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene una secuencia de aminoácidos específica puede prevenir y/o tratar eficazmente la enfermedad neurodegenerativa tal como enfermedad de Alzheimer y mejorar significativamente los síntomas asociados con la enfermedad neurodegenerativa. El anticuerpo anti-Sema 3A también condujo a una mejora drástica de la tasa de supervivencia y prolongación del periodo de supervivencia en un modelo patológico de septicemia mortal. Además, los presentes inventores han encontrado que el anticuerpo anti-Sema 3A permite disminuir el nivel en sangre de inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), un factor de empeoramiento de la coagulación intravascular diseminada. Sema 3A induce migración/invasión y tolerancia farmacológica de células cancerosas. Los presentes inventores también han encontrado que el anticuerpo anti-Sema 3A puede suprimir la migración/invasión y la tolerancia farmacológica de células cancerosas y por tanto el anticuerpo puede minimizar la alteración maligna de cáncer.

Adicionalmente, los presentes inventores también han encontrado que puede medirse proteína Sema 3A mediante ELISA usando un anticuerpo anti-Sema 3A que contiene una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos específica.

Los presentes inventores han estudiado adicionalmente basándose en tales hallazgos y han completado la presente invención. Es decir, la presente invención proporciona la invención de los siguientes aspectos:

Punto 1. Un anticuerpo anti-semaforina 3A que contiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera mostradas en (A) o fragmento de anticuerpo del mismo que contiene una región de unión a antígeno del mismo:

(A) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2; y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, y

una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4; CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5; y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6.

Punto 2. El anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según el punto 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo de los mismos.

Punto 3. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según el punto 1 ó 2.

Punto 4. La composición farmacéutica según el punto 3, en la que la composición es para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, septicemia, cáncer, coagulación intravascular diseminada, enfermedad del sistema nervioso central o periférico, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, enfermedad infecciosa o enfermedad alérgica.

Punto 5. La composición farmacéutica según el punto 4, en la que el cáncer es cáncer intestinal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cerebral, melanoma, cáncer de células renales, leucemia, linfoma, linfoma de células T, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer de ovarios, cáncer de esófago, cáncer de hígado, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de las vías urinarias, cáncer de próstata, coriocarcinoma, cáncer de faringe o cáncer de laringe.

Punto 6. La composición farmacéutica según el punto 4, en la que la coagulación intravascular diseminada acompaña a al menos uno seleccionado del grupo que consiste en septicemia, leucemia aguda, cáncer sólido, separación prematura de placenta implantada de manera normal, embolia de líquido amniótico, traumatismo, lesión por quemadura, enfermedad de tejido conjuntivo, choque, aneurisma aórtico, hepatitis aguda, cirrosis hepática, pancreatitis aguda, rabdomiólisis, trombosis y enfermedad infecciosa grave.

Punto 7. La composición farmacéutica según el punto 4, en la que la enfermedad del sistema nervioso central o periférico es dolor neuropático, lesión de la médula espinal o enfermedad neurodegenerativa.

Punto 8. La composición farmacéutica según el punto 4, en la que la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, degeneración de la sustancia negra, síndrome de Shy-Drager, atrofia olivopontocerebelosa o degeneración espinocerebelosa.

Punto 9. La composición farmacéutica según el punto 4, en la que la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo I, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico o esclerosis múltiple.

Punto 10. La composición farmacéutica según el punto 4, en la que la enfermedad inflamatoria es septicemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, artritis, hepatitis, espondiloartritis o enfermedad de Sjogren.

Punto 11. La composición farmacéutica según el punto 4, en la que la enfermedad infecciosa es enfermedad infecciosa bacteriana, encefalitis, meningitis, endocarditis, hepatitis C, gripe, síndrome respiratorio agudo grave, neumonía, septicemia, lesión o traumatismo por quemadura, enfermedad infecciosa.

Punto 12. La composición farmacéutica según el punto 4, en la que la enfermedad alérgica es rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial o alergia alimentaria.

Punto 13. Un método para medir proteína Sema 3A, que comprende medir proteína Sema 3A en una muestra usando un inmunoensayo con el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según el punto 1 ó 2.

Punto 14. Un kit para medir proteína Sema 3A, que comprende el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según el punto 1 ó 2.

Punto 15. El método para medir proteína Sema 3A según el punto 13,

medir proteína Sema 3A mediante inmunoensayo de tipo sándwich,

usar el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según el punto 1 como anticuerpo de captura, y

usar el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo mostrado en (B) o (C) como anticuerpo primario:

(B) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 61, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62, y

una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 64, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 65, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 66;

(C) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 69, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70, y

una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 72, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 74.

Punto 16. El método para medir proteína Sema 3A según el punto 13,

medir proteína Sema 3A mediante inmunoensayo de tipo sándwich,

usar el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo mostrado en (D) o (E) como anticuerpo de captura:

(D) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 78, y

una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 80, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 81, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 82;

- 5 (E) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 84, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 85, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 86, y

- 10 una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 89, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 90, y

usar el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según el punto 1 como anticuerpo primario.

- 15 Punto 17. El kit según el punto 14,

que se usa para medir proteína Sema 3A mediante inmunoensayo de tipo sándwich,

- 20 que contiene el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según el punto 1 como anticuerpo de captura, y

que contiene el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo mostrado en (B) o (C) como anticuerpo primario:

- 25 (B) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 61, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62, y

- 30 una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 64, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 65, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 66;

- 35 (C) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 69, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70, y

- 40 una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 72, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 74.

Punto 18. El kit según el punto 14,

que se usa para medir proteína Sema 3A mediante inmunoensayo de tipo sándwich,

- 45 que contiene el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo mostrado en (D) o (E) como anticuerpo de captura:

- 50 (D) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 78, y

- 55 una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 80, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 81, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 82;

- (E) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 84, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 85, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 86, y

- 60 una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 89, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 90, y

- 65 que contiene el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según el punto 1 como anticuerpo primario.

## Ventajas de la invención

El anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención puede prevenir y/o tratar eficazmente enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, etc. y mejorar significativamente síntomas asociados con la enfermedad neurodegenerativa. Sin desear limitarse a una interpretación restringida para cualquier mecanismo de acción del anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención, se cree que el anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención inhibe eficazmente una función de la proteína Sema 3A, para bloquear así la señalización de Sema 3A, dando como resultado una reducción de la acumulación de proteína mediadora de respuesta a colapsina (CRMP) fosforilada en el ovillo neurofibrilar. El anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención también es eficaz para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedad del sistema nervioso central o periférico distinta de enfermedad neurodegenerativa, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, enfermedad infecciosa y enfermedad alérgica, etc. y en particular, puede mostrar efectos prominentes de profilaxis y/o tratamiento de enfermedad inflamatoria tal como septicemia, que está provocada por un mecanismo de colapso de inmunidad debido a infección o potentes estímulos de inducción de inflamación. El anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención puede suprimir eficazmente las actividades de migración/invasión de células cancerosas inducidas por Sema 3A y eliminar la falta de respuesta a fármaco anticanceroso inducida por Sema 3A para recuperar la sensibilidad farmacológica, y por tanto también es eficaz para la profilaxis y/o el tratamiento de cáncer. Además, el anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención tiene la acción de suprimir el aumento del nivel en sangre de PAI-1 y, por tanto, también es eficaz para la profilaxis y/o el tratamiento de coagulación intravascular diseminada.

El anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención puede usarse en la medición de proteína Sema 3A. En particular, el uso del anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención permite medir proteína Sema 3A incluso en presencia de suero de una manera altamente precisa y por tanto medir proteína Sema 3A en una muestra biológica.

## Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un gráfico que ilustra 13 clones productores de anticuerpo anti-Sema 3A preparados en el ejemplo 1.

La figura 2 muestra un gráfico que ilustra resultados de evaluación de la especificidad de unión del anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A producido en el ejemplo 1 frente a proteína Sema 3A.

La figura 3 muestra los resultados de aplicar anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A, anticuerpo humanizado anti-Sema 3A y anticuerpo quimérico de ave-humano anti-Sema 3A a electroforesis seguido por tinción con CBB.

La figura 4 muestra resultados de prueba de reactividad de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A, anticuerpo humanizado anti-Sema 3A y anticuerpo quimérico de ave-humano anti-Sema 3A frente a antígenos de Sema 3A humana y Sema 3A de ratón.

La figura 5 muestra resultados medidos de afinidad de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A, anticuerpo humanizado anti-Sema 3A y anticuerpo quimérico de ave-humano anti-Sema 3A frente a proteína Sema 3A mediante ELISA de competencia.

La figura 6 muestra resultados medidos de Sema 3A en muestras libres de suero mediante ELISA de tipo sándwich con el anticuerpo anti-Sema 3A producido en los ejemplos 2 a 4.

La figura 7 muestra resultados medidos de Sema 3A en muestras que contienen suero mediante ELISA de tipo sándwich con el anticuerpo anti-Sema 3A producido en los ejemplos 2.

La figura 8 muestra resultados de ensayo de colapso con proteína Sema 3A derivada de pollo y anticuerpo de ave anti-Sema 3A.

La figura 9 muestra resultados de ensayo de colapso con proteína Sema 3A derivada de pollo y anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A.

La figura 10 muestra resultados de ensayo de colapso con proteína Sema 3A derivada de pollo y anticuerpo de ave anti-Sema 3A.

La figura 11 muestra resultados de ensayo de colapso con proteína Sema 3A derivada de pollo y anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A.

La figura 12 muestra resultados de ensayo de unión de anticuerpo de ave anti-Sema 3A frente a proteína Sema 3A derivada de humano.

La figura 13 muestra resultados de ensayo de unión de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A frente a

proteína Sema 3A derivada de humano.

La figura 14 muestra resultados de ensayo de unión de anticuerpo de ave anti-Sema 3A frente a proteína Sema 3F derivada de humano.

Las figuras 15A y 15B muestran gráficos que ilustran resultados del ejemplo 10. La figura 15A muestra un gráfico que ilustra resultados de la tasa de acceso al objeto B en ensayos de adquisición de tarea de reconocimiento de nuevo objeto. La figura 15B muestra un gráfico que ilustra resultados de la tasa de acceso al objeto C en ensayos de prueba de tarea de reconocimiento de nuevo objeto.

La figura 16 muestra un diagrama que ilustra resultados del ejemplo 15. La figura es una representación gráfica combinada de curvas de supervivencia de tres pruebas de la administración de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A mediante método de Kaplan-Meier.

La figura 17 muestra un diagrama que ilustra resultados del ejemplo 16. La figura es una representación gráfica de curvas de supervivencia de grupo con administración de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A de 500 µg y grupo de control negativo mediante método de Kaplan-Meier.

La figura 18 muestra un diagrama que ilustra resultados del ejemplo 17. La figura es una representación gráfica de curvas de supervivencia de grupo con administración de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A de 500 µg una hora después de que un ratón al que se le inoculó lipopolisacárido presentó estado inflamatorio y grupo de control negativo mediante método de Kaplan-Meier.

La figura 19 muestra un diagrama que ilustra resultados del ejemplo 18. La figura es un diagrama que ilustra resultados medidos de niveles en sangre de inhibidor del activador de plasminógeno-1 de ratones para determinar efectos de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre ratones de modelo de coagulación intravascular diseminada.

La figura 20 muestra un gráfico que ilustra resultados del ejemplo 19. La figura muestra resultados analizados de efectos de proteína Sema 3A y/o anticuerpo humanizado anti-Sema 3A para la capacidad de migración celular en células de cáncer de páncreas humanas (MIAPaCa-2).

La figura 21 muestra un gráfico que ilustra resultados del ejemplo 20. La figura muestra un gráfico que ilustra resultados de ensayo de invasión celular con línea celular de cáncer de páncreas humanas (MIAPaCa-2).

La figura 22 muestra un gráfico que ilustra resultados del ejemplo 20. La figura muestra un gráfico que ilustra resultados de ensayo de invasión celular con línea celular de pancreatoblastoma humano (U87MG).

La figura 23 muestra un gráfico que ilustra resultados del ejemplo 20. La figura muestra un gráfico que ilustra resultados de ensayo de invasión celular con línea celular de cáncer de pulmón derivada de ratón (3LL).

La figura 24 muestra imágenes fotográficas que ilustran resultados del ejemplo 20. La figura muestra imágenes de microscopio de células invadidas obtenidas mediante tinción a lo largo del ensayo de invasión celular con línea celular de cáncer de pulmón derivada de ratón (3LL).

La figura 25 muestra un gráfico que ilustra resultados del ejemplo 21. La figura muestra resultados analizados de efecto de proteína Sema 3A y/o anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre la sensibilidad frente a clorhidrato de gemcitabina en células de cáncer de páncreas humanas (MIAPaCa-2).

## Realizaciones de la invención

### 1. Anticuerpo anti-Sema 3A y fragmento de anticuerpo del mismo

El anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención se caracteriza por la inclusión de una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 a CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos específicas y una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 a CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos específicas.

El anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención puede unirse específicamente a proteína Sema 3A e inhibir eficazmente una función de la proteína. La proteína Sema 3A es una proteína endógena que se codifica por un gen que pertenece a la subfamilia de semaforina de clase III y se identifica como factor que colapsa el cono de crecimiento neuronal para suprimir así la elongación de axones. La secuencia de aminoácidos de la proteína Sema 3A se conoce (número de registro de GenBank; NP\_006071.1 para derivada de humano, NP\_033178.2 para derivada de ratón).

Los ejemplos preferidos de un aspecto del anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención incluyen una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera mostradas en el siguiente punto (A);

(A) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6.

También se divulga un anticuerpo anti-Sema 3A que incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera mostradas en los siguientes puntos (B) a (E):

(B) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 61 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62 y una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 64, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 65 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 66,

(C) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 69 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70 y una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 72, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 74,

(D) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 78 y una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 80, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 81 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 82,

(E) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 84, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 85 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 86 y una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 89 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 90.

En el anticuerpo anti-Sema 3A de la presente divulgación las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 en una cadena pesada y una cadena ligera (SEQ ID NO: 1-6, 60-62, 64-66, 68-70, 72-74, 76-78, 80-82, 84-86 y 88-90) pueden ser aquellas en las que se sustituyen, delecionan, añaden y/o insertan uno o unos pocos aminoácidos. El anticuerpo anti-Sema 3A que contiene secuencias de CDR en las que se sustituyen, delecionan, añaden y/o insertan uno o unos pocos aminoácidos tiene de manera deseable una actividad de unión frente a proteína Sema 3A igual a o mayor que la de anticuerpo anti-Sema 3A que contiene secuencias de CDR sin modificar. El número de aminoácidos sustituidos, delecionados, añadidos y/o insertados incluye preferiblemente, pero no se limita particularmente a, de 1 a 3, más preferiblemente de 1 a 2, de manera particularmente preferible 1 por cada CDR. En las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 en una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo anti-Sema 3A de la presente divulgación pueden sustituirse, delecionarse, añadirse y/o insertarse aminoácidos en una secuencia de aminoácidos y pueden sustituirse, delecionarse, añadirse y/o insertarse en dos o más secuencias de aminoácidos.

En la sustitución de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos de CDR, se prefiere una sustitución por el aminoácido correspondiente (es decir, sustitución de aminoácidos conservativa) ya que se espera que la actividad de unión de anticuerpo no cambie mediante la sustitución. En particular, se establece la siguiente categoría basándose en propiedades de cadenas laterales de aminoácidos:

aminoácido básico: lisina, arginina y histidina,

aminoácido ácido: ácido glutámico y ácido aspártico,

aminoácido neutro: glicina, alanina, serina, treonina, metionina, cisteína, fenilalanina, triptófano, tirosina, leucina, isoleucina, valina, glutamina, asparagina y prolina.

Además, el aminoácido neutro descrito anteriormente puede clasificarse en uno que tiene una cadena lateral polar (asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina y cisteína), uno que tiene una cadena lateral no polar (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano), uno que tiene una cadena lateral que contiene amida (asparagina y glutamina), uno que tiene una cadena lateral que contiene azufre (metionina y cisteína), uno que tiene una cadena lateral aromática (fenilalanina, triptófano y tirosina), uno que tiene una cadena lateral que contiene hidroxilo (serina, treonina y tirosina) y uno que tiene una cadena lateral alifática (alanina, leucina, isoleucina y valina), etc.

Un método de sustitución de uno o varios residuos de aminoácido por otros aminoácidos deseados objetivo incluye, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh T. *et al.*, Gene, vol. 152, pág. 271-275 (1995); Zoller M.J. *et al.*, Methods Enzymol. vol. 100, pág. 468-500 (1983), Kramer W. *et al.*, Nucleic Acids Res. vol. 12, pág. 9441-9456 (1984); Kramer W. *et al.*, Methods Enzymol. vol. 154, pág. 350-367 (1987); Kunkel T.A., Proc Natl Acad Sci USA., vol. 82, pág. 488-492 (1985) y otros), y el uso de tal mutagénesis dirigida al sitio permite realizar sustitución de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de CDR. Otro método de sustitución por otro aminoácido incluye una técnica de biblioteca descrita en el documento WO2005/080432.

En el anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención, las secuencias de aminoácidos en la región de entramado de la región variable y en la región constante no están particularmente limitadas a menos que las secuencias de aminoácidos afecten sustancialmente a la actividad de unión frente a proteína Sema 3A.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 (SEQ ID NO: 1-6, 60-62, 64-66, 68-70, 72-74, 76-78, 80-82, 84-86 y 88-90) se derivan de un anticuerpo de ave, y el anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención puede ser un anticuerpo de ave, preferiblemente un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que regiones que tienen diferentes orígenes se conjugan entre sí. En el caso en el que se usa un anticuerpo quimérico como anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención, como composiciones farmacéuticas y agentes terapéuticos de diversas enfermedades, se usa de manera deseable un anticuerpo quimérico de ave-humano que está compuesto por una región variable derivada de anticuerpo de ave y una región constante derivada de anticuerpo humano o un anticuerpo quimérico de ave-ratón que está compuesto por una región variable derivada de anticuerpo de ave y una región constante derivada de anticuerpo de ratón, más preferiblemente un anticuerpo quimérico de ave-humano. En el caso en el que se usa un anticuerpo quimérico en un inmunoensayo y un kit para la medición de proteína Sema 3A, puede usarse un anticuerpo quimérico de ave-humano y un anticuerpo quimérico de ave-ratón y a lo cual también se añade un anticuerpo quimérico de ave-conejo que está compuesto por una región variable derivada de anticuerpo de ave y una región constante derivada de anticuerpo de conejo y un anticuerpo quimérico de ave-cabra que está compuesto por una región variable derivada de anticuerpo de ave y una región constante derivada de anticuerpo de cabra. Las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 7, 8, 59, 67, 75 y 83 se muestran como ejemplos de una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada usada para un anticuerpo quimérico de ave-humano, un anticuerpo quimérico de ave-ratón, un anticuerpo quimérico de ave-conejo o un anticuerpo quimérico de ave-conejo. La secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 9, 10, 63, 71, 79 y 87 también se muestran como ejemplos de una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera usada para un anticuerpo quimérico de ave-humano, un anticuerpo quimérico de ave-ratón, un anticuerpo quimérico de ave-conejo o un anticuerpo quimérico de ave-conejo. Cuando estas secuencias de aminoácidos de regiones variables (SEQ ID NO: 7 a 10, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83 y 87) tienen, cada una, una actividad de unión frente a proteína Sema 3A igual a o mayor que la de una secuencia de aminoácidos sin modificar, pueden sustituirse, delecionarse, añadirse y/o insertarse uno o varios aminoácidos. El número de aminoácidos sustituidos, delecionados, añadidos y/o insertados no está particularmente limitado, y es por ejemplo, de 1 a 21, preferiblemente de 1 a 14, más preferiblemente de 1 a 3 en la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 7, 8, 59, 67, 75, 83) y/o la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 9, 10, 63, 71, 79, 87). Obsérvese que en la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 7, 8, 59, 67, 75, 83) y/o la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 9, 10, 63, 71, 79, 87), de manera deseable se sustituyen, delecionan, añaden y/o insertan aminoácidos en otra región excepto en las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3. En las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera, la sustitución de aminoácidos es de manera deseable sustitución de aminoácidos conservativa tal como se describió anteriormente.

Un anticuerpo humanizado es uno en el que una secuencia de CDR no derivada de humano se injerta en una región de entramado de un anticuerpo humano y uno que contiene una secuencia de CDR derivada de anticuerpo no humano, una región de entramado derivada de anticuerpo humano y una región constante derivada de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado tiene una antigenicidad reducida en el cuerpo humano y, por tanto, es adecuado para aplicaciones farmacéuticas del anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención. La secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 se muestra como ejemplo de secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada usadas para un anticuerpo humanizado. Además, las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 12 y 13 se muestran como ejemplos de secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera usadas para un anticuerpo humanizado. Cuando estas secuencias de aminoácidos de regiones variables (SEQ ID NO: 11 a 13) tienen, cada una, una actividad de unión frente a proteína Sema 3A igual a la de secuencias de aminoácidos sin modificar, pueden sustituirse, delecionarse, añadirse y/o insertarse uno o varios aminoácidos. El número de aminoácidos sustituidos, delecionados, añadidos y/o insertados no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, de 1 a 21, preferiblemente de 1 a 14, más preferiblemente de 1 a 3 en la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 11) y/o la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 12 y 13). Obsérvese que en la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 11) y/o la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 12 y 13), de manera deseable se sustituyen, delecionan, añaden y/o insertan aminoácidos en otra región excepto en las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3. En las secuencias de aminoácidos en regiones variables de cadena pesada y cadena ligera, la sustitución de aminoácidos es de manera deseable una sustitución de aminoácidos conservativa tal como se describió anteriormente.

Un anticuerpo quimérico puede producirse, por ejemplo, sustituyendo una región constante de anticuerpo de ave que contiene la región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera que tienen cada una de las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 por una región constante de anticuerpo humano (por ejemplo Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 81, pág. 6851-6855 (1984); Neuberger *et al.*, Nature, vol. 312, pág. 604-608 (1984); Takeda *et al.*, Nature, vol. 314, pág. 452-454 (1985) y otros). Las secuencias de nucleótidos de ADN que codifican para las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 7, 8, 59, 67, 75 y 83 en la región variable de cadena pesada usada para un anticuerpo quimérico de ave-humano se muestran en SEQ ID NO: 14, 15, 103, 111, 119 y 127, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de ADN que codifican para las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 9, 10, 63, 71, 79 y 87 en la región variable de cadena ligera usadas para un anticuerpo quimérico de ave-humano se muestran en SEQ ID NO: 16, 17, 104, 112, 120 y 128, respectivamente. Pueden usarse secuencias de aminoácidos conocidas en la región constante de anticuerpo humano. En particular, un anticuerpo quimérico de ave-humano puede producirse mediante el siguiente procedimiento.

En primer lugar, se produce ADN que codifica para una región variable de cadena pesada de ave que contiene una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos dada mediante síntesis química, escisión bioquímica, reconjugación y similares. El ADN que codifica para región variable de cadena pesada obtenido se liga con ADN que codifica para región constante de cadena pesada humana, que después se incorpora en un vector para expresión para producir un vector de expresión de cadena pesada. Se produce un vector de expresión de cadena ligera de la misma manera tal como se describió anteriormente. El vector de expresión de cadena pesada y el vector de expresión de cadena ligera obtenidos se usan para transformar conjuntamente una célula huésped tal como línea celular HEK293, células CHO, células SP2/0, etc. Se cultiva el transformante, seguido por separación de anticuerpo quimérico objetivo a partir de la disolución de cultivo de transformante. Alternativamente, pueden sustituirse aminoácidos de una región de entramado en la región variable de anticuerpo de modo que una CDR de un anticuerpo quimérico de ave-humano forma un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato, K. *et al.*, Cancer Research, vol. 53, pág. 851-856 (1993)).

Un anticuerpo humanizado puede producirse, por ejemplo, injertando las CDR 1 a 3 que contienen las secuencias de aminoácidos en una región de entramado de un anticuerpo humano (por ejemplo Jones *et al.*, Nature, vol. 321, pág. 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, vol. 332, pág. 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, vol. 239, pág. 1534-1536 (1988)). Las secuencias de nucleótidos de ADN que codifican para CDR 1 de cadena pesada (SEQ ID NO: 1, 60, 68, 76 y 84) se muestran en SEQ ID NO: 18, 97, 105, 113 y 121, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de ADN que codifican para CDR 2 de cadena pesada (SEQ ID NO: 2, 61, 69, 77 y 85) se muestran en SEQ ID NO: 19, 98, 106, 114 y 122, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de ADN que codifican para CDR 3 de cadena pesada (SEQ ID NO: 3, 62, 70, 78 y 86) se muestran en SEQ ID NO: 20, 99, 107, 115 y 123, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de ADN que codifican para CDR 1 de cadena ligera (SEQ ID NO: 4, 64, 72, 80 y 88) se muestran en SEQ ID NO: 21, 100, 108, 116 y 124, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de ADN que codifican para CDR 2 de cadena ligera (SEQ ID NO: 5, 65, 73, 81 y 89) se muestran en SEQ ID NO: 22, 101, 109, 117 y 125, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de ADN que codifican para CDR 3 de cadena ligera (SEQ ID NO: 6, 66, 74, 82 y 90) se muestran en SEQ ID NO: 23, 102, 110, 118 y 126, respectivamente. En particular, un anticuerpo humanizado puede producirse mediante el siguiente procedimiento.

Un anticuerpo humanizado puede producirse tratando las CDR 1 a 3 que tienen secuencias de aminoácidos dadas y ADN que codifica para región variable de cadena pesada ligado con cuatro regiones de entramado derivadas de anticuerpos humanos en un orden dado mediante síntesis química, escisión bioquímica, reconjugación, etc. En este caso, los aminoácidos de las regiones de entramado pueden mutarse mediante sustitución, delección y/o adición, etc. de modo que las CDR de anticuerpo humanizado forman sitios de unión a antígeno adecuados (Sato, K. *et al.*, Cancer Research, vol. 53, pág. 851-856 (1993)). El ADN que codifica para región variable de cadena pesada obtenido se liga con un ADN que codifica para región constante de cadena pesada humana, que después se incorpora en un vector para expresión para producir un vector de expresión de cadena pesada. Se produce un vector de expresión de cadena ligera de la misma manera tal como se describió anteriormente. El vector de expresión de cadena pesada y el vector de expresión de cadena ligera obtenidos se usan para transformar conjuntamente células huésped tales como línea celular FreeStyle 293 (Life Technologies), células CHO, células SP2/0, etc. Se cultiva el transformante, seguido por separación de anticuerpo humanizado objetivo a partir de la disolución de cultivo de transformante. Una secuencia de nucleótidos de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 en la región variable de cadena pesada usada para un anticuerpo humanizado se muestra en SEQ ID NO: 24. Las secuencias de nucleótidos de ADN que codifican para las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 12 y 13 en la región variable de cadena ligera usadas para un anticuerpo humanizado se muestran en SEQ ID NO: 25 y 26. Pueden usarse secuencias de aminoácidos conocidas en una región constante de anticuerpo humano.

Los isotipos del anticuerpo anti-Sema 3A de la presente invención no están particularmente limitados y los ejemplos de los mismos incluyen IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (IgA1 e IgA2), IgM, IgD e IgE, por ejemplo. Entre ellos, se prefiere IgG.

En la presente invención, también puede usarse un fragmento de anticuerpo siempre que la región de unión a antígeno de anticuerpo anti-Sema 3A esté contenida en el mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, etc. Estos fragmentos de anticuerpo pueden producirse según los métodos

convencionales.

El anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención puede ser un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo conjugado con diversos compuestos tales como polietilenglicol, una sustancia radiactiva, toxina, etc. El anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención puede tratarse modificando una cadena de azúcar unida o fusionando con otras proteínas, según sea necesario.

## 2. Composición farmacéutica

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo. La composición farmacéutica de la presente invención puede inhibir eficazmente una función de la proteína Sema 3A y lograr diversas eficacias farmacológicas al contener anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo.

En la composición farmacéutica de la presente invención, el anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo, que está contenido como componente activo, puede estar en cualquier forma del aspecto (A) y se prefiere el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo del aspecto (A) con el fin de inhibir eficazmente una función de la proteína Sema 3A y lograr una eficacia farmacológica prominente.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener simplemente una cantidad eficaz del anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo y puede contener de otro modo un portador o aditivo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de un portador o un aditivo de este tipo incluyen un tensioactivo, un excipiente, un colorante, un agente aromatizante, un conservante, un estabilizante, un tampón, un tampón de pH, un disgregante, un solubilizante, un adyuvante de solubilización, un agente de tonicidad, un aglutinante, un disgregante, un lubricante, un diluyente, un corrector, etc., por ejemplo. El portador o aditivo no se limita a los mismos y también pueden usarse otros portadores o aditivos habitualmente usados en composiciones farmacéuticas, según sea aplicable.

Una forma de administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser en forma o bien oral o bien parenteral, y los ejemplos particulares de la misma incluyen administración oral; y administración parenteral tal como administraciones intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transnasal, pulmonar, dérmica, transmucosa, intraocular, etc.

Una formulación de la composición farmacéutica de la presente invención puede establecerse de manera apropiada dependiendo de la forma de administración que va a adoptarse. Por ejemplo, en el caso de la administración oral, la composición puede prepararse en la formulación de un polvo, un gránulo, una cápsula, un jarabe, una suspensión, etc., y en el caso de la administración parenteral, la composición puede prepararse en la formulación de un líquido, una suspensión, una emulsión, una pulverización, un supositorio, un colirio, etc.

La composición farmacéutica de la presente invención puede inhibir eficazmente una función de la proteína Sema 3A mediante la acción de anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo y por tanto es útil para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades que implican proteína Sema 3A. Los ejemplos de enfermedades que implican proteína Sema 3A incluyen, por ejemplo, enfermedad del sistema nervioso central o periférico, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, enfermedad infecciosa, enfermedad alérgica y cáncer, etc. Los ejemplos particulares de enfermedad del sistema nervioso central o periférico incluyen dolor neuropático, lesión de la médula espinal y enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, degeneración de la sustancia negra, síndrome de Shy-Drager, atrofia olivopontocerebelosa y degeneración espinocerebelosa, etc.). Los ejemplos particulares de enfermedad autoinmunitaria incluyen artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo I, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, etc. Los ejemplos particulares de enfermedad inflamatoria incluyen septicemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, artritis, hepatitis, espondiloartritis, síndrome de Sjogren, etc. Los ejemplos particulares de enfermedad infecciosa incluyen enfermedad infecciosa bacteriana, encefalitis/meningitis, endocarditis, hepatitis C, gripe/síndrome respiratorio agudo grave (SARS), neumonía, septicemia, lesión o traumatismo por quemadura, enfermedad infecciosa, etc. Los ejemplos particulares de enfermedad alérgica incluyen rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia alimentaria, etc. Los ejemplos particulares de cáncer incluyen cáncer intestinal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cerebral, melanoma, cáncer de células renales, leucemia, linfoma, linfoma de células T, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer de ovarios, cáncer de esófago, cáncer de hígado, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de las vías urinarias, cáncer de próstata, coriocarcinoma, cáncer de faringe, cáncer de laringe, etc.

El anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo puede suprimir eficazmente la capacidad inhibidora de la regeneración neuronal de la proteína Sema 3A para acelerar la regeneración y elongación de nervios y por tanto la composición farmacéutica de la presente invención es útil como composición farmacéutica para regenerar y elongar nervios (es decir, composición farmacéutica para regeneración y elongación neuronal). La composición farmacéutica

de la presente invención también permite regenerar y elongar los propios nervios mediante anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo y, por tanto, es específicamente útil como composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa.

Además, el anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo muestra efectos prominentes de profilaxis y/o tratamiento de enfermedad inflamatoria que contiene septicemia, otra enfermedad asociada con tormenta de citocinas, tal como enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), síndrome de dificultad respiratoria agudo (ARDS), gripe aviar, viruela, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), tormenta de citocinas inducida por fármaco, etc., que están provocados por un mecanismo de colapso de inmunidad debido a infección o potente estímulo de inducción de inflamación y por tanto el anticuerpo o su fragmento de anticuerpo es altamente útil como composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de estas enfermedades.

El anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo puede suprimir eficazmente las actividades de migración/invasión de células cancerosas inducidas por Sema 3A y muestra efectos prominentes de profilaxis y/o tratamiento de enfermedades asociadas con empeoramiento/progresión de cáncer y, por tanto, es altamente útil como composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades cancerosas. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se usa para aplicaciones de profilaxis y/o tratamiento de cáncer, puede usarse otro fármaco anticanceroso en combinación. El anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo puede eliminar específicamente la falta de respuesta a fármaco anticanceroso de células cancerosas inducida por Sema 3A para recuperar la sensibilidad farmacológica, y por tanto muestra efectos prominentes de profilaxis y/o tratamiento de cáncer en combinación con otros fármacos anticancerosos. En el caso de uso combinado de anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo con otro fármaco anticanceroso, el anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo y otro fármaco anticanceroso pueden prepararse en una composición farmacéutica individual para su formulación y el anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo y otro fármaco anticanceroso pueden prepararse en composiciones farmacéuticas diferentes para su formulación.

La composición farmacéutica de la presente invención puede suprimir el aumento del nivel en sangre de PAI-1 mediante la acción de anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo y, por tanto, también es eficaz para la profilaxis y/o el tratamiento de coagulación intravascular diseminada. Los ejemplos de enfermedades subyacentes asociadas con coagulación intravascular diseminada incluyen septicemia, leucemia aguda, cáncer sólido, separación prematura de placenta implantada de manera normal, embolia de líquido amniótico, traumatismo, lesión por quemadura, enfermedad de tejido conjuntivo, choque, aneurisma aórtico, hepatitis aguda, cirrosis hepática, pancreatitis aguda, trombosis, enfermedad infecciosa grave, etc.

La dosificación y frecuencia de la composición farmacéutica de la presente invención varían dependiendo del método de administración, edad y peso corporal del paciente, tipos de enfermedad y grados de gravedad de síntomas, etc. y, por tanto, no pueden definirse de manera uniforme. Sin embargo, la regeneración neuronal requiere habitualmente de unos pocos días a unos pocos meses o más y, por tanto, la composición se administra preferiblemente a la frecuencia necesaria para suprimir la actividad de semaforina durante el proceso de regeneración neuronal. Por ejemplo, la composición puede administrarse a la cantidad correspondiente a de 0,1 mg a 1000 mg, preferiblemente de 1 mg a 500 mg en peso de anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo por dosis una vez cada aproximadamente de 1 a 30 días. Obsérvese que la composición también puede administrarse en forma de un agente de liberación sostenida o en porciones a lo largo de un periodo prolongado mediante una bomba osmótica con el fin de reducir la frecuencia de administración. En todos estos métodos de administración, se usa preferiblemente una vía de administración y un método de administración en los que la composición tiene una concentración que permite inhibir de manera suficiente la actividad de proteína Sema 3A en el sitio de acción.

### 3. Método de medición y kit de medición de proteína Sema 3A

La presente invención proporciona un método de medición de proteína Sema 3A usando anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo. El método de medición de la presente invención mide de manera inmunológica Sema 3A en una muestra mediante reacción antígeno-anticuerpo de anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo con Sema 3A en la muestra.

En el método de medición de la presente invención, el anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo reactivo con Sema 3A en una muestra puede ser el aspecto (A) y se menciona preferiblemente el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo del aspecto (A) con el fin de medir proteína Sema 3A de una manera más precisa.

Una muestra no está particularmente limitada siempre que se requiera la medición de Sema 3A, y los ejemplos de la misma incluyen, por ejemplo, muestras biológicas tales como sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, linfa, líquido amniótico, líquido de mama, diversos líquidos tisulares, extracto de hipocampo y diversos extractos tisulares, etc.

Para el método de medición de la presente invención, puede adoptarse cualquier inmunoensayo que contiene

método de tipo sándwich, método de competencia, método de coagulación, etc. En el caso en el que se adopta un método de tipo sándwich, que usa un anticuerpo de captura que atrapa un antígeno y un anticuerpo primario que se une al antígeno conjugado con el anticuerpo de captura, como método de medición de la presente invención, el anticuerpo de captura puede ser uno cualquiera seleccionado del anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo en los aspectos (A) a (E), y el diferente en los aspectos (A) a (E) del anticuerpo de captura seleccionado puede usarse como anticuerpo primario. En el caso en el que se adopta un método de tipo sándwich, se prefiere particularmente que el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo en el aspecto (A) se use como anticuerpo de captura y el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo en el aspecto (B) o (C) se use como anticuerpo primario dado que la proteína Sema 3A puede medirse particularmente en presencia de suero de una manera más precisa.

El inmunoensayo incluye ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo fluorescente, radioinmunoensayo que depende de tipos de marcador, y cualquiera de estos métodos puede usarse para el método de medición de la presente invención. Se menciona preferiblemente ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas a la vista de la simplicidad y rapidez de medición.

El inmunoensayo que usa una reacción antígeno-anticuerpo se conoce en sí mismo y el método de medición de la presente invención puede llevarse a cabo mediante cualquier enfoque conocido dependiendo de mecanismos de medición y tipos de marcador de inmunoensayo.

La presente invención también proporciona un kit de medición usado en el método de medición. El kit de medición de la presente invención incluye anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo.

El kit de medición de la presente invención puede contener otros reactivos e instrumentos junto con anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo dependiendo de mecanismos de medición y tipos de marcador para el inmunoensayo. Por ejemplo, en el caso en el que se selecciona ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, el kit puede contener una placa de medición, una disolución de sustrato cromogénico, una disolución de extinción, una disolución de lavado, una muestra de patrón, etc., junto con anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo. En el caso en el que se adopta el método de tipo sándwich, el anticuerpo anti-Sema 3A o su fragmento de anticuerpo usado como anticuerpo de captura puede proporcionarse en estado inmovilizado en una fase sólida.

## Ejemplos

La presente invención se describe con referencia a los ejemplos en detalle a continuación, sin embargo, debe interpretarse que la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1: preparación de anticuerpo anti-Sema 3A (anticuerpo de ave y anticuerpo quimérico de ave-ratón)

### 1) Cultivo celular

Se llevó a cabo el cultivo celular de células DT40 derivadas de células B de pollo según el siguiente procedimiento. Se usa un termostato de CO<sub>2</sub> como incubadora, en el que se llevó a cabo el cultivo en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% a 39,5°C. Se usa medio IMDM (Life Technologies), al que se añadieron FBS al 10% en volumen, suero de pollo al 1% en volumen, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2-mercaptoetanol 55 µM para su uso en el presente documento. Se disolvió tricostatina A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en DMSO hasta 5 mg/ml para preparar una disolución madre y se diluyó de manera apropiada la disolución madre en el medio hasta la concentración final de 1,25 ng/ml o 2,5 ng/ml antes de su uso.

### 2) Aislamiento de células productoras de anticuerpo anti-Sema 3A

Se produjo proteína Sema 3A de ratón a partir de célula que expresaba proteína Sema 3A de ratón propiedad de Molecular Pharmacology and Neurobiology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, proteína que se usó como antígeno para aislar células productoras de anticuerpo usando el sistema Autonomously Diversifying Library (ADLib) (Chiome Bioscience, Inc.). En particular, se llevó a cabo el siguiente procedimiento de experimentación.

#### 2-1) Preparación de perlas magnéticas con antígeno inmovilizado

Se llevó a cabo la inmovilización de proteína Sema 3A de ratón a perlas magnéticas para cola de His según el siguiente procedimiento. Se usaron Dynabeads TALON (Life Technologies) como perlas magnéticas y se usó Dynal MPC (Life Technologies) como soporte magnético.

Se lavaron las perlas (22,5 µl) con 45 µl de tampón de PBS tres veces, que después se hicieron reaccionar con 6,1 µg de proteína Sema 3A de ratón en tampón de PBS a 4°C durante 10 minutos mientras se agitaba de manera rotatoria. Posteriormente, se lavaron las perlas conjugadas con proteína Sema 3A de ratón cuatro veces con 45 µl

de tampón C (tampón de PBS que contiene BSA al 0,1%) y después se suspendieron en 45 µl de tampón C.

## 2-2) Selección de clon productor de anticuerpo mediante perlas magnéticas con antígeno inmovilizado

- 5 Se cultivaron células DT40 de tipo natural durante 5 semanas o más en medio IMDM que contenía 1,25 ng/ml o 2,5 ng/ml de tricostatina A y  $8 \times 10^8$  de las células cultivadas se dividieron en 8 porciones de  $1 \times 10^8$  células cada una, cada una de las cuales se lavó una vez con 10 ml de disolución de lavado (tampón de PBS que contiene BSA al 1% en peso), seguido por lavado una vez en 1 ml de la misma disolución de lavado y después se mezclaron con  $5 \times 10^6$  de las perlas magnéticas con antígeno inmovilizado preparadas en 2-1) en 1 ml de disolución de lavado.
- 10 Después se incubó la mezcla a 4°C durante 30 minutos mientras se hacía rotar suavemente y posteriormente se lavó tres veces con 1,7 ml de disolución de lavado durante 3 minutos usando KingFisher mL (Thermo Fisher Scientific K.K.). Finalmente, se suspendieron las células asociadas con perlas magnéticas con antígeno inmovilizado en 500 µl de medio, que se añadieron a 20 ml de medio y después se dispensaron en una placa de 96 pocillos a 200 µl en cada uno y se incubaron a 39,5°C. En el siguiente procedimiento, se usó medio IMDM (Life Technologies)
- 15 que contenía FBS al 10% en volumen, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2-mercaptoetanol 55 µM como medio de cultivo.

## 2-3) Selección de clon productor de anticuerpo anti-Sema 3A

- 20 Se llevó a cabo un ELISA en fase sólida directo según el siguiente procedimiento. En el día 6 tras la etapa 2-2), se dispensaron 2,5 µg/ml de proteína Sema 3A de ratón en una placa de 384 pocillos Maxisorp (Nunc) a 20 µl en cada uno y se dejaron reposar durante la noche. Se inmovilizaron ovalbúmina (OA) e IgG de conejo (rlgG) en la placa como controles negativos de manera similar con el fin de examinar la especificidad de anticuerpos. Al día siguiente, se retiró el contenido de la placa y se añadieron a la misma 45 µl de disolución de bloqueo (tampón de PBS que contiene BSA al 1%), seguido por incubación a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó la placa cinco veces
- 25 con 120 µl/pocillo de tampón de lavado de ELISA (PBS que contiene Tween 20 al 0,05% en peso), al que se añadieron sobrenadantes de cultivo derivados de la colonia obtenida mediante selección en la etapa 2-2) a 25 µl/pocillo y después se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó la placa cinco veces con 120 µl/pocillo de disolución de lavado de ELISA y a la que después se añadieron 25 µl de diluyente en el que se diluyó un anticuerpo secundario 2000 veces con un tampón de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente durante
- 30 45 minutos. Se usó anticuerpo anti-IgM de pollo-HRP (Bethyl Laboratories, Inc.) como anticuerpo secundario. Se lavó cada pocillo cinco veces con 120 µl de tampón de lavado de ELISA, a lo que se añadieron 25 µl de TMB+ (Dako) y se incubaron durante 30 minutos. Posteriormente, se extinguió la reacción con 25 µl de ácido sulfúrico 1 N para determinar la absorbancia a 450 nm.

- 35 Por consiguiente, se obtuvieron trece cepas celulares que mostraban ser positivas para la producción de anticuerpo anti-Sema 3A mediante ELISA de fase sólida directa mediante la selección por asociación directa con perlas magnéticas con antígeno inmovilizado, tal como se muestra en la figura 1.

- 40 Entre las cepas positivas obtenidas, se llevó a cabo la clonación de las cepas celulares nº 4 y nº 6 para células productoras de anticuerpo mediante dilución limitante, según el siguiente procedimiento.

- Cada una de ambas cepas se preparó hasta  $1 \times 10^3$  células/ml, 150 µl de lo cual se añadieron a 60 ml de medio y se sembró la suspensión en tres placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific K.K.) en una cantidad de 200 µl/pocillo,
- 45 seguido por cultivo estacionario durante 7 días. Se sometieron veinte clones de las cepas, que se observó que formaban colonias celulares, a selección de clones productores de anticuerpo frente a Sema 3A de ratón según el método descrito en la etapa 2-3). Se seleccionaron clones que mostraron ser positivos para la producción de anticuerpo frente a Sema 3A de ratón a 2 clones de cada una de las cepas y después se sometieron a cultivo celular a alta densidad.

- 50 En el cultivo celular a alta densidad, se sometieron los clones a cultivo prolongado y se amplificaron hasta  $4 \times 10^7$  células. Se observó que los clones se amplificaban hasta recuentos celulares suficientes y se cultivaron los clones con CELLLine CL-1000 (BD biosciences) en medio AIM-V que contenía componente de suero de pollo al 20% en volumen (Life Technologies). Un componente de suero de pollo es un suero de pollo en el que se retiraron los anticuerpos. El procedimiento de preparación comprendía retirar inmunoglobulina como precipitado con sulfato de amonio saturado al 50% a partir de suero de pollo (Life Technologies), someter a diálisis el sobrenadante con
- 55 tampón de PBS, y concentrar el sobrenadante usando un dispositivo Centri Prep (Amicon) para ajustar el aumento de volumen provocado por la diálisis. Tras cultivar durante aproximadamente 96 horas, se continuó el cultivo hasta que la tasa de supervivencia de células era del 50% o menos mientras se medía la tasa de supervivencia. Cuando la
- 60 tasa de supervivencia disminuyó hasta el 50% o menos, se recogió el sobrenadante de cultivo.

## 3) Preparación de sobrenadante de cultivo para ELISA

- 65 Se preparó sobrenadante de cultivo para analizar un título mediante ELISA mediante el siguiente procedimiento, con el fin de retirar IgM derivada de suero, etc. Se añadió un componente de suero de pollo a medio AIM-V libre de suero

(Life Technologies) a una concentración del 3%. Se añadieron células al medio preparado a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml y se cultivaron durante 2 días para obtener sobrenadante de cultivo.

#### 4) Selección de clones productores de anticuerpo anti-Sema 3A

El sobrenadante de cultivo para ELISA obtenido en la etapa 3) se sometió a ELISA para medir la concentración de anticuerpo anti-Sema 3A y así obtener la cepa de clon n.º 4-2 que tiene una alta capacidad de producción de anticuerpo anti-Sema 3A.

#### 5) Preparación de sobrenadante de cultivo que contiene anticuerpo de ave anti-Sema 3A (IgM)

Se cultivó la cepa de clon n.º 4-2 productora de anticuerpo de ave anti-Sema 3A obtenida en la etapa 4) con medio IMDM en una incubadora de CO<sub>2</sub> en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% a 39,5°C y se recogió el sobrenadante de cultivo.

#### 6) Preparación de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A (IgG)

Se sintetizó ADNc a partir de ARN total extraído de la cepa de clon n.º 4-2 productora de anticuerpo anti-Sema 3A obtenida en la etapa 4) mediante transcripción inversa con una transcriptasa inversa (SuperScript III, Life Technologies) y un cebador oligomérico (dT). Se usó el ADNc obtenido como molde y se amplificaron genes de región variable de cadena ligera mediante PCR usando un cebador sentido que contenía la secuencia de región variable de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo de ave (cebador 1: GAAGATCTAAGCTTGCCATGGCCTGGCTCCTCTCCT (SEQ ID NO: 27)) y un cebador antisentido que contenía la secuencia de región variable de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo de ave y la secuencia de región constante de cadena ligera de anticuerpo de ratón (cebador 2: TGGCGAAGACTTCGGCTGGCCTAGGAC (SEQ ID NO: 28)). Al mismo tiempo, se amplificaron genes de región variable de cadena pesada mediante PCR usando un cebador sentido que contenía la secuencia de región variable de cadena pesada de anticuerpo de ave (cebador 3: GAAGATCTAAGCTTACCATGAGCCCACTCG (SEQ ID NO: 29)) y un cebador antisentido que contenía la región variable de cadena pesada de anticuerpo de ave y región constante de anticuerpo IgG2a de ratón (cebador 4: CGATGGGGCTGTTGTTTTGGCGGAGGAGACGATGACTTC (SEQ ID NO: 30)). Por otro lado, se usó la secuencia de ADN de región constante de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo de ratón como molde y se amplificaron genes de región constante de cadena ligera de ratón mediante PCR usando un cebador sentido que contenía una secuencia de cebador sentido de la región variable de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo de ave y la secuencia región constante de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo de ratón (cebador 5: AAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTTCCA (SEQ ID NO: 31)) y un cebador antisentido (cebador 6: TATGCGGCCGCTTACTAGGAACAGTCA (SEQ ID NO: 32)). Adicionalmente, se usó la secuencia de ADNc de región constante de cadena pesada de anticuerpo IgG2a de ratón como molde y se amplificaron genes de región constante de cadena pesada de ratón mediante PCR usando un cebador sentido que contenía una secuencia de cebador sentido de la región variable de cadena pesada de anticuerpo de ave y la secuencia de región constante de cadena pesada de anticuerpo IgG2a de ratón (cebador 7: GCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCT (SEQ ID NO: 33)) y un cebador antisentido (cebador 8: AGATAGCGGCCGCTTATCATTTACCCGG (SEQ ID NO: 34)).

Se usaron el fragmento de región variable de cadena ligera y el fragmento de región constante de cadena ligera amplificados como molde y se amplificaron genes de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón mediante PCR usando el cebador 1 y el cebador 6. Además, se usaron el fragmento de región variable de cadena pesada y el fragmento de región constante de cadena pesada amplificados como molde y se amplificaron genes de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón mediante PCR usando el cebador 3 y el cebador 8.

Los genes de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón y los genes de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón se digirieron con enzimas de restricción Hind III y Not I, respectivamente, cada uno de los cuales se clonó entonces en el sitio Hind III-Not I de un plásmido pCEP4 para expresión en células de mamífero (Life Technologies). La secuencia del gen de anticuerpo clonado se analizó mediante secuenciación usando un secuenciador de ADN. Se tradujeron las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón y la cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón basándose en las secuencias de nucleótidos analizadas. La secuencia de aminoácidos traducida final de la cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón se muestra en SEQ ID NO: 35 y la secuencia de aminoácidos traducida final de la cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón se muestra en SEQ ID NO: 36.

El plásmido construido en la etapa anterior se transfectó en la línea celular FreeStyle 293 (Life Technologies) usando un método de polietilenimina y se sometieron a cultivo con agitación a 37°C, CO<sub>2</sub> al 8% y 135 rpm durante 7 días para recoger el sobrenadante de cultivo.

Se cuantificó la concentración de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A (IgG) contenido en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA. Se purificó el anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A a partir del sobrenadante de cultivo usando una columna preparada cargando Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) en columnas de cromatografía Poly-Prep (Bio-Rad Laboratories, Inc). Se realizó un intercambio de

disolvente del anticuerpo eluido por tampón de PBS usando una columna PD-10 (GE Healthcare).

Se midió la especificidad de antígeno del anticuerpo purificado mediante ELISA con tampón de PBS. Se dispensaron 2,5 µg/ml de antígeno en una placa de 96 pocillos Maxi Sorp (Nunc) y se hicieron reaccionar durante la noche a 4°C para recubrir la placa con un antígeno (proteína Sema 3A de ratón). Se inmovilizaron ovoalbúmina, IgG de conejo y leche desnatada en la placa como controles negativos de manera similar con el fin de examinar la especificidad de anticuerpos. Al día siguiente, se lavó la placa tres veces con 200 µl/pocillo de disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%), a lo que se añadieron 200 µl/pocillo de disolución de bloqueo (PBS que contiene leche desnatada al 0,5%) y se hizo reaccionar la mezcla durante 30 minutos. Se lavó la placa tres veces con 200 µl/pocillo de disolución de lavado, a lo que se añadieron 100 µl de sobrenadante de cultivo que contenía anticuerpo y se hizo reaccionar la mezcla durante una hora. Se lavó la placa cinco veces con 200 µl/pocillo de disolución de lavado, a lo que se añadieron 100 µl/pocillo de diluyente en el que se diluyó anticuerpo de cabra anti-IgG2A de ratón marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Bethyl Laboratories, Inc.) 2000 veces con tampón de PBS y se hizo reaccionar la mezcla durante una hora. Se lavó la placa cinco veces con 200 µl/pocillo de disolución de lavado, a lo que se añadieron 100 µl/pocillo de TMB+ (Dako) y se hizo reaccionar la mezcla de manera cromogénica durante cinco minutos. Posteriormente, a la placa se le añadieron 100 µl de ácido sulfúrico 1 M para extinguir la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm usando un espectrómetro µQuantBiomolecular (Bio Tek Instruments, Inc.). Los resultados se muestran en la figura 2.

#### 7) Determinación de secuencias de CDR en región variable de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A

Se determinó la secuencia de CDR del anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A obtenido en la etapa anterior. La secuencia de CDR se determinó según el método de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interest, publicación de NIH, 91-3242). Por consiguiente, se especificaron las siguientes secuencias como las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de una cadena pesada y una cadena ligera.

[Tabla 1]

| Anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A (derivado del clon n.º 4-2) |                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CDR 1 de cadena pesada                                                     | SYPMG (SEQ ID NO: 1)<br>(correspondiente a las posiciones 31 a 35 de SEQ ID NO: 35)             |
| CDR 2 de cadena pesada                                                     | GIDDDGSDTRYAPAVKG (SEQ ID NO: 2)<br>(correspondiente a las posiciones 50 a 67 de SEQ ID NO: 35) |
| CDR 3 de cadena pesada                                                     | HTGIGANSAGSIDA (SEQ ID NO: 3)<br>(correspondiente a las posiciones 100 a 113 de SEQ ID NO: 35)  |
| CDR 1 de cadena ligera                                                     | SGGGSYTGSYYYG (SEQ ID NO: 4)<br>(correspondiente a las posiciones 21 a 33 de SEQ ID NO: 36)     |
| CDR 2 de cadena ligera                                                     | YNNKRPS (SEQ ID NO: 5)<br>(correspondiente a las posiciones 50 a 56 de SEQ ID NO: 36)           |
| CDR 3 de cadena ligera                                                     | GSADNSGDA (SEQ ID NO: 6)<br>(correspondiente a las posiciones 89 a 97 de SEQ ID NO: 36)         |

#### Ejemplo 2: preparación de anticuerpo anti-Sema 3A (anticuerpo humanizado y anticuerpo quimérico de ave-humano)

##### 1) Construcción de genes de anticuerpo humanizado (humanizado 1 y humanizado 2)

Se diseñaron dos anticuerpos humanizados (humanizado 1 y humanizado 2) alterando aminoácidos en la región de entramado de un anticuerpo humano a partir de aquellos en la región de entramado de la región variable de anticuerpo anti-Sema 3A producido por la cepa de clon n.º 4-2 obtenida en la etapa 4) del ejemplo 1.

Los genes que codifican para la secuencia de aminoácidos diseñada de cadena pesada (las secuencias de humanizado 1 y 2 son iguales) y de cadena ligera de humanizado 1 se sintetizaron por separado teniendo en cuenta la optimización de codones para su expresión en células humanas. Alternativamente, se usó la secuencia génica de cadena ligera de humanizado 1 como molde y el producto amplificado mediante PCR usando un cebador sentido (cebador A<sub>γ</sub>: GAAGATCTAAGCTTCCACCATGGCAT (SEQ ID NO: 37)) y un cebador antisentido (cebador B<sub>γ</sub>: TTGTAATAGATCACTGTACGGA (SEQ ID NO: 38)) y el producto amplificado mediante PCR usando un cebador sentido (cebador C<sub>γ</sub>: TCCCGTGACAGTGATCTATTACAA (SEQ ID NO: 39)) y un cebador antisentido (cebador D<sub>γ</sub>: AGATAGCGCGCTTAGGAACATTC (SEQ ID NO: 40)) se sometieron a PCR de ensamblaje usando un cebador sentido A<sub>γ</sub> y un cebador antisentido D<sub>γ</sub> con el fin de sintetizar cadena ligera de humanizado 2.

##### 2) Construcción de genes de anticuerpo quimérico de ave-humano

Se construyeron genes de anticuerpo quimérico de ave-humano de la siguiente manera. Se usó ADNc de la cepa de clon n.º 4-2 obtenida en la etapa 4) del ejemplo 1 como molde y se amplificaron genes de región variable de cadena

ligera mediante PCR usando un cebador sentido que contenía la secuencia de región variable de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo de ave (cebador E $\gamma$ : GAAGATCTAAGCTTCCACCATGGCCTGGGCTCCTCT (SEQ ID NO: 41)) y un cebador antisentido que contenía la secuencia de región variable de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo de ave y secuencia de región constante de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo humano (cebador F $\gamma$ : CTTTGGGCTGGCCTAGGACGGTCAGGGTTGT (SEQ ID NO: 42)). Alternativamente, se amplificaron genes de región variable de cadena pesada mediante PCR usando un cebador sentido que contenía la secuencia de región variable de cadena pesada de anticuerpo de ave (cebador G $\gamma$ : GAAGATCTAAGCTTCCACCATGAGCCCACTCG (SEQ ID NO: 43)) y un cebador antisentido que contenía la región variable de cadena pesada de anticuerpo de ave y región constante de anticuerpo humano IgG1 (cebador H $\gamma$ : GCCCCTTTGTACTAGCGGAGGAGACGATGACTTC (SEQ ID NO: 44)). Por otro lado, se usó la secuencia de ADN de región constante de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo humano humanizado 1 sintetizada como molde y se amplificaron genes de región constante de cadena ligera  $\lambda$  humana mediante PCR usando un cebador sentido que contenía la secuencia de región constante de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo humano (cebador I $\gamma$ : GGCCAGCCCAAAGCCAACCCTACCGTG (SEQ ID NO: 45)) y un cebador antisentido (cebador J $\gamma$ : AGATAGCGGCCGCTTATTAGGAACATTTCGTT (SEQ ID NO: 46)). Además, se usó la secuencia de ADN sintetizada de región constante de cadena pesada de anticuerpo IgG1 humano humanizado 1 como molde y se amplificaron genes de región constante de cadena pesada de IgG1 humana mediante PCR usando un cebador sentido que contenía la secuencia de región constante de cadena pesada de anticuerpo IgG1 humano (cebador K $\gamma$ : GCTAGTACAAAGGGGCCCTCAGTGTCCCACTG (SEQ ID NO: 47)) y un cebador antisentido (cebador L $\gamma$ : AGATAGCGGCCGCTTATTATTTCCAGGTGACAG (SEQ ID NO: 48)).

Se usaron el fragmento de región variable de cadena ligera y el fragmento de región constante de cadena ligera amplificados como molde y se amplificaron genes de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-humano mediante PCR usando el cebador E $\gamma$  y el cebador J $\gamma$ . Además, se usaron el fragmento de región variable de cadena pesada y el fragmento de región constante de cadena pesada amplificados como molde y se amplificaron genes de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-humano mediante PCR usando el cebador G $\gamma$  y el cebador L $\gamma$ .

### 3) Construcción de vector de expresión y expresión, purificación y medición de concentración de proteína

El gen de cadena ligera y el gen de cadena pesada de humanizado 1, el gen de cadena ligera y el gen de cadena pesada de humanizado 2, y el gen de cadena ligera y el gen de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-humano sintetizados se digirieron con enzimas de restricción Hind III y Not I, cada uno de los cuales se clonó en el sitio Hind III-Not I de un plásmido pCEP4 para expresión en células de mamífero (Life Technologies). Se analizó la presencia de las secuencias génicas de anticuerpo clonadas mediante secuenciación usando un secuenciador de ADN. Se tradujeron secuencias de aminoácidos de un anticuerpo humanizado (humanizado 1 y humanizado 2) y una cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-humano basándose en las secuencias de nucleótidos secuenciadas.

La secuencia de aminoácidos determinada final de cadena pesada de anticuerpos humanizados (humanizado 1 y humanizado 2) se muestra en SEQ ID NO: 49 y la secuencia de nucleótidos que codifica para secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 50. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO: 49) contiene la secuencia de aminoácidos de la región variable mostrada en SEQ ID NO: 11. Además, la secuencia de aminoácidos determinada final de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 1) se muestra en SEQ ID NO: 51 y la secuencia de nucleótidos que codifica para secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 52. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 51) contiene la secuencia de aminoácidos de la región variable mostrada en SEQ ID NO: 12. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos determinada final de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 2) se muestra en SEQ ID NO: 53 y la secuencia de nucleótidos que codifica para secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 54. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 53) contiene la secuencia de aminoácidos de la región variable mostrada en SEQ ID NO: 13.

La secuencia de aminoácidos determinada final de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado del clon n.º 4-2) se muestra en SEQ ID NO: 55 y la secuencia de nucleótidos que codifica para secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 56. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO: 55) contiene la secuencia de aminoácidos de la región variable mostrada en SEQ ID NO: 8. Además, la secuencia de aminoácidos determinada final de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado del clon n.º 4-2) se muestra en SEQ ID NO: 57 y la secuencia de nucleótidos que codifica para secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 58. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 57) contiene la secuencia de aminoácidos de la región variable mostrada en SEQ ID NO: 10.

El plásmido de expresión construido en la etapa anterior se transfectó en línea celular FreeStyle 293 (Life Technologies) mediante polietilenimina y se sometió a cultivo con agitación a 37°C, CO<sub>2</sub> al 8% y 135 rpm durante 7 días para recoger el sobrenadante de cultivo.

Se purificaron anticuerpos anti-Sema 3A humanizados (humanizado 1 y humanizado 2) y anticuerpo quimérico de ave-humano a partir del sobrenadante de cultivo usando una columna preparada cargando Protein A Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) en columnas de cromatografía Poly-Prep (Bio-Rad Laboratories, Inc). Se realizó un

intercambio de disolvente del anticuerpo eluido por tampón de PBS usando una columna PD-10 (GE Healthcare).

Se calculó el coeficiente de absorbancia molecular a partir de la composición de aminoácidos del anticuerpo purificado y se determinó la concentración mediante método de absorbancia en ultravioleta. Se sometieron 500 ng del anticuerpo purificado en estado reducido o no reducido a electroforesis y se tiñó el gel con azul brillante de Coomassie (CBB). Los resultados se muestran en la figura 3. La figura 3 también muestra resultados de electroforesis con tinción con CBB del anticuerpo de ave-ratón obtenido en el ejemplo 1 y anticuerpo quimérico de ave-ratón CL18M(+) (control).

Ejemplo de referencia 3: preparación de anticuerpo anti-Sema 3A (anticuerpo quimérico de ave-ratón)

Se obtuvieron ocho cepas celulares que mostraban ser positivas para la producción de anticuerpo anti-Sema 3A en el mismo procedimiento de selección de anticuerpos que en las etapas 1) y 2) del ejemplo 1 excepto porque se usó proteína Sema 3A humana como antígeno y se usaron células DT40 en las que la región constante de IgM de pollo se sustituyó por la de ratón IgG. Se usaron las cepas n.º 165 y n.º 582 entre los clones que mostraron ser positivos para la producción de anticuerpo anti-Sema 3A para la preparación y purificación de anticuerpo anti-Sema 3A para obtener anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A (IgG) (derivado de cepa de clon n.º 165 y cepa de clon n.º 582). Se llevaron a cabo las secuenciaciones de regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A y de CDR, respectivamente. La secuencia de CDR se determinó según el método de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interest, publicación de NIH, 91-3242). Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

[Tabla 2]

| Anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A (derivado de cepa de clon n.º 165) |                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Región variable de cadena pesada                                                  | AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFTFS<br>SYEMQWVRQAPGKGLEWVAGIYTGSTWYGA<br>AVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTA<br>IYYCAKSGIGVNSAAFIDAWGHGTEVIVSS<br>(SEQ ID NO: 59) |
| CDR 1 de cadena pesada                                                            | SYEMQ (SEQ ID NO: 60) (correspondiente a las posiciones 31 a 35 de SEQ ID NO: 59)                                                                       |
| CDR 2 de cadena pesada                                                            | GIYTGSTWYGAAVKG (SEQ ID NO: 61) (correspondiente a las posiciones 50 a 64 de SEQ ID NO: 59)                                                             |
| CDR 3 de cadena pesada                                                            | SGIGVNSAAFIDA (SEQ ID NO: 62) (correspondiente a las posiciones 97 a 109 de SEQ ID NO: 59)                                                              |
| Región variable de cadena ligera                                                  | ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYGGSY<br>YYGWYQQKAPGSAPVTVIYNNNKRPSNIPS<br>RFGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGS<br>ADNSGTAFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 63)                  |
| CDR 1 de cadena ligera                                                            | SGGGSYGGSYYYG (SEQ ID NO: 64) (correspondiente a las posiciones 21 a 33 de SEQ ID NO: 63)                                                               |
| CDR 2 de cadena ligera                                                            | NNNKRPS (SEQ ID NO: 65) (correspondiente a las posiciones 50 a 56 de SEQ ID NO: 63)                                                                     |
| CDR 3 de cadena ligera                                                            | GSADNSGTA (SEQ ID NO: 66) (correspondiente a las posiciones 89 a 97 de SEQ ID NO: 63)                                                                   |

[Tabla 3]

| Anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A (derivado de cepa de clon n.º 582) |                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Región variable de cadena pesada                                                  | AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFTMS<br>SYEMQWVRQAPGKGLEWVAIYTRSTWYGA<br>AVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTG<br>TYYCAKSGIGLNSAAFIDAWGHGTEVIVSS<br>(SEQ ID NO: 67) |
| CDR 1 de cadena pesada                                                            | SYEMQ (SEQ ID NO: 68) (correspondiente a las posiciones 31 a 35 de SEQ ID NO: 67)                                                                      |
| CDR 2 de cadena pesada                                                            | AIYTRSTWYGAAVKG (SEQ ID NO: 69) (correspondiente a las posiciones 50 a 64 de SEQ ID NO: 67)                                                            |
| CDR 3 de cadena pesada                                                            | SGIGLNSAAFIDA (SEQ ID NO: 70) (correspondiente a las posiciones 97 a 109 de SEQ ID NO: 67)                                                             |

|                                  |                                                                                                                                         |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Región variable de cadena ligera | ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYGGSY<br>YYGWYQQKAPGSAPVTVIYTNNKRPSNIPS<br>RFSGLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGS<br>ADNSGTAFGAGTTTLTVL (SEQ ID NO: 71) |
| CDR 1 de cadena ligera           | SGGGSYGGSYYYG (SEQ ID NO: 72) (correspondiente a las posiciones 21 a 33 de SEQ ID NO: 71)                                               |
| CDR 2 de cadena ligera           | TNNKRPS (SEQ ID NO: 73) (correspondiente a las posiciones 50 a 56 de SEQ ID NO: 71)                                                     |
| CDR 3 de cadena ligera           | GSADNSGTA (SEQ ID NO: 74) (correspondiente a las posiciones 89 a 97 de SEQ ID NO: 71)                                                   |

Ejemplo de referencia 4: preparación de anticuerpo anti-Sema 3A (anticuerpo de ave y anticuerpo quimérico de ave-humano)

#### 5 1) Preparación de anticuerpo de ave (IgM)

Se usó proteína Sema 3A de ratón como antígeno y se llevó a cabo la selección de anticuerpo en el mismo procedimiento que las etapas 1) y 2) en el ejemplo 1 para obtener clones que mostraron ser positivos para la producción de anticuerpo anti-Sema 3A. Entre los clones, se usaron la cepa 240-40 y la cepa 255-72 para la preparación y purificación de anticuerpo anti-Sema 3A para obtener anticuerpo de ave anti-Sema 3A (derivado de cepa de clon n.º 240-40 y cepa de clon n.º 255-72). Se llevaron a cabo las secuenciaciones de regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo de ave anti-Sema 3A y de CDR, respectivamente. La secuencia de CDR se determinó según el método de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interest, publicación de NIH, 91-3242). Los resultados se muestran en las tablas 4 y 5.

[Tabla 4]

| Anticuerpo de ave anti-Sema 3A (derivado de cepa de clon n.º 240-40) |                                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Región variable de cadena pesada                                     | AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSS<br>YDMNWVRQAPGKGLEWVAGIYSGSSTYYGAA<br>VKGRATISRDNQGSTLRLQLNNLRAEDTGIY<br>YCAKSAIPVNSAGSIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 75) |
| CDR 1 de cadena pesada                                               | SYDMN (SEQ ID NO: 76) (correspondiente a las posiciones 31 a 35 de SEQ ID NO: 75)                                                                     |
| CDR 2 de cadena pesada                                               | GIYSGSSTYYGAAVKG (SEQ ID NO: 77) (correspondiente a las posiciones 50 a 65 de SEQ ID NO: 75)                                                          |
| CDR 3 de cadena pesada                                               | SAIPVNSAGSIDA (SEQ ID NO: 78) (correspondiente a las posiciones 98 a 110 de SEQ ID NO: 75)                                                            |
| Región variable de cadena ligera                                     | ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYGGSY<br>YSWHQQKSPGSALVTVIYYNNKRPSDIPSRF<br>SGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADT<br>SGTAFGAGTTTLTVL (SEQ ID NO: 79)               |
| CDR 1 de cadena ligera                                               | SGGGSYGGSYYYYS (SEQ ID NO: 80) (correspondiente a las posiciones 21 a 33 de SEQ ID NO: 79)                                                            |
| CDR 2 de cadena ligera                                               | YNNKRPS (SEQ ID NO: 81) (correspondiente a las posiciones 50 a 56 de SEQ ID NO: 79)                                                                   |
| CDR 3 de cadena ligera                                               | GSADTSGTA (SEQ ID NO: 82) (correspondiente a las posiciones 89 a 97 de SEQ ID NO: 79)                                                                 |

[Tabla 5]

| Anticuerpo de ave anti-Sema 3A (derivado de cepa de clon n.º 255-72) |                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Región variable de cadena pesada                                     | AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSS<br>YEMQWVRQAPGKGLEWVAGIYSGSTWYGAAV<br>KGRATISRDNQGSTVRLQLNNLRAEDTGTY<br>CAKSGIGFNSAGSIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 83) |
| CDR 1 de cadena pesada                                               | SYEMQ (SEQ ID NO: 84) (correspondiente a las posiciones 31 a 35 de SEQ ID NO: 83)                                                                   |
| CDR 2 de cadena pesada                                               | GIYSGSTWYGAAVKG (SEQ ID NO: 85) (correspondiente a las posiciones 50 a 64 de SEQ ID NO: 83)                                                         |

|                                  |                                                                                                                                          |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CDR 3 de cadena pesada           | SGIGFNSAGSIDA (SEQ ID NO: 86) (correspondiente a las posiciones 97 a 109 de SEQ ID NO: 83)                                               |
| Región variable de cadena ligera | ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYGGSYYY<br>YSWHQQKSPGSALVTVIYYNNKRPSDIPSRF<br>SGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADN<br>SGSAFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 87) |
| CDR 1 de cadena ligera           | SGGGSYGGSYYS (SEQ ID NO: 88) (correspondiente a las posiciones 21 a 33 de SEQ ID NO: 87)                                                 |
| CDR 2 de cadena ligera           | YNNKRPS (SEQ ID NO: 89) (correspondiente a las posiciones 50 a 56 de SEQ ID NO: 87)                                                      |
| CDR 3 de cadena ligera           | GSADNSGSA (SEQ ID NO: 90) (correspondiente a las posiciones 89 a 97 de SEQ ID NO: 87)                                                    |

## 2) Preparación de anticuerpo quimérico de ave-humano (IgG1)

- Se sintetizó ADNc a partir de ARN total extraído a partir de cepa de clon n.º 240-40 productor de anticuerpo anti-Sema 3A y de cepa de clon n.º 255-72 productor de anticuerpo anti-Sema 3A mediante transcripción inversa con una transcriptasa inversa (SuperScript III, Life Technologies). Se usó el ADNc obtenido como molde y se amplificaron genes de región variable de cadena ligera mediante PCR usando un cebador sentido que contenía una secuencia de región variable de cadena ligera  $\lambda$  de anticuerpo de ave (cebador M $\gamma$ : AGCTTGCTAGCGGCCACCATGGCCTGGGCTCCTCTC (SEQ ID NO: 91)) y un cebador antisentido (cebador N $\gamma$ : TCTGGCGGCCGCTAGACTCACCTAGGACGGTCAGGGTTGTC (SEQ ID NO: 92)). Alternativamente, se amplificaron genes de región variable de cadena pesada mediante PCR usando un cebador sentido que contenía una secuencia de región variable de cadena pesada de anticuerpo de ave (cebador O $\gamma$ : AGCTTGCTAGCGGCCACCATGAGCCCACTCGTCTCC (SEQ ID NO: 93)) y un cebador antisentido (cebador P $\gamma$ : TCTGGCGGCCGCTAGACTCACCGGAGGAGACGATGACTTC (SEQ ID NO: 94)).
- Se produjeron las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 95 en la región constante de cadena pesada y SEQ ID NO: 96 en la región constante de cadena ligera mediante síntesis total de sus genes y se digirieron ambas secuencias con Not I y Eag I, que después se unieron al sitio Not I de un vector pCEP4 (Life Technologies).
- Se clonó la secuencia de región variable amplificada en el vector que contenía la región constante construido de la manera anterior. En particular, se digirieron ambos de un vector de constante de cadena pesada y un vector de región constante de cadena ligera con Not I y se unieron ADNc de región variable de cadena pesada y ADNc de región variable de cadena ligera a cada vector usando el kit de clonación In-fusion HD (TAKARA BIO INC.).
- Se transfectó el plásmido construido en la etapa anterior en la línea celular FreeStyle 293 (Life Technologies) mediante polietilenimina y se sometió a cultivo con agitación a 37°C, CO<sub>2</sub> al 8%, 135 rpm para recuperar sobrenadante de cultivo, que se purificó mediante proteína A para obtener anticuerpo quimérico de ave-humano anti-Sema 3A (IgG1) (derivado de cepa de clon n.º 240-40 y cepa de clon n.º 255-72).
- ### Ejemplo 5: medición de especificidad antigénica
- Se midieron el anticuerpo quimérico de ave-ratón obtenido en el ejemplo 1 y los anticuerpos humanizados (humanizado 1 y humanizado 2) y anticuerpo quimérico de ave-humano obtenidos en el ejemplo 2 para determinar la especificidad antigénica mediante ELISA en fase sólida de antígeno con tampón de PBS. También se midió el anticuerpo quimérico de ave-ratón obtenido en el ejemplo 1, que se marcó con biotina, para determinar la especificidad antigénica. También se midió el anticuerpo quimérico de ave-ratón CL18M(+), que sirvió como control negativo, para determinar la especificidad antigénica. Las condiciones de medición particulares fueron de la siguiente manera.
- En primer lugar, se dispensaron 2,5  $\mu$ g/ml de antígeno (proteína Sema 3A de ratón y humana) en una placa de 384 pocillos MaxiSorp (Nunc) y se hicieron reaccionar durante la noche a 4°C con el fin de recubrir la placa con el antígeno. De lo contrario, se inmovilizaron ovoalbúmina (OVA) y albúmina de suero bovino (BSA) en la placa como controles negativos de manera similar con el fin de examinar la especificidad de anticuerpos. Tras la reacción, se lavó la placa tres veces con 50  $\mu$ l/pocillo de disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%), a lo que se añadieron 25  $\mu$ l/pocillo de disolución de bloqueo (tampón de PBS que contiene albúmina de suero bovino al 1%), y se hizo reaccionar la mezcla durante 30 minutos. Se lavó el producto resultante tres veces con 50  $\mu$ l/pocillo de disolución de lavado, a lo que se añadieron 20  $\mu$ l/pocillo de anticuerpos respectivos y se hizo reaccionar la mezcla durante una hora. Se lavó el producto resultante cinco veces con 50  $\mu$ l/pocillo de disolución de lavado, a lo que se añadieron 20  $\mu$ l de diluyente en el que se diluyó anticuerpo de cabra anti-cadena ligera  $\lambda$  humana marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (SouthernBiotech) 4000 veces con tampón de PBS, en el que se diluyó anticuerpo de cabra anti-IgG2A de ratón marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Bethyl Laboratories, Inc.) 2000 veces con tampón de PBS o en el que se diluyó estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (HRP) (Thermo Fisher

Scientific K.K.) 10000 veces con tampón de PBS y se hizo reaccionar la mezcla durante una hora. Se lavó la placa cinco veces con 50  $\mu$ l/pocillo de disolución de lavado, a lo que se añadieron 20  $\mu$ l/pocillo de TMB+ (Dako) y se hizo reaccionar la mezcla de manera cromogénica durante 20 minutos. Posteriormente, a cada pocillo se le añadieron 20  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1 M para extinguir la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm usando un dispositivo Infinite M1000 (Tecan Trading AG).

Los resultados se muestran en la figura 4. Tal como se muestra aparentemente en la figura 4, se observa que los anticuerpos obtenidos en los ejemplos 1 y 2 muestran reactividad con antígeno de Sema 3A humana y Sema 3A de ratón, pero no muestran reactividad con ovalbúmina y BSA usadas como antígenos negativos. Los resultados muestran que los anticuerpos obtenidos en los ejemplos 1 y 2 muestran reactividad cruzada específica frente a Sema 3A.

#### Ejemplo 6: medición de la afinidad frente a antígeno 1

El anticuerpo quimérico de ave-ratón derivado de clon n.º 4-2 obtenido en el ejemplo 1, los anticuerpos humanizados obtenidos en el ejemplo 2 (humanizado 1 y humanizado 2) y el anticuerpo quimérico de ave-humano se sometieron a ELISA de competencia para evaluar la afinidad frente al antígeno. También se midió el anticuerpo quimérico de ave-ratón CL18M(+), que sirvió como control negativo, para determinar la afinidad frente al antígeno. Las condiciones de medición particulares fueron de la siguiente manera.

En primer lugar, se dispensaron 2,5  $\mu$ g/ml de antígeno (proteína Sema 3A de ratón y humana) en una placa de 384 pocillos MaxiSorp (Nunc) y se hicieron reaccionar durante la noche a 4°C con el fin de recubrir la placa con el antígeno. Al día siguiente, se lavó la placa tres veces con 50  $\mu$ l/pocillo de disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%), a lo que se añadieron 25  $\mu$ l/pocillo de disolución de bloqueo (PBS que contiene albúmina de suero bovino al 1%) y se hizo reaccionar la mezcla durante 30 minutos. Cada uno de los anticuerpos humanizados (humanizado 1 y humanizado 2), el anticuerpo quimérico de ave-humano y el anticuerpo quimérico de ave-ratón se sometió a dilución doble en serie, a lo que se mezcló el anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A marcado con biotina a la concentración final de 60 ng/ml, y se hizo reaccionar la mezcla con la placa en fase sólida de antígeno que se lavó tres veces con 50  $\mu$ l/pocillo de disolución de lavado durante una hora. Se lavó la placa cinco veces con 50  $\mu$ l/pocillo de disolución de lavado, a lo que se añadieron 20  $\mu$ l/pocillo de diluyente en el que se diluyó estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (HRP) (Thermo Fisher Scientific K.K.) 10000 veces con tampón de PBS y se hizo reaccionar la mezcla durante 30 minutos. Se lavó la placa cinco veces con 50  $\mu$ l/pocillo de disolución de lavado, a lo que se añadieron 20  $\mu$ l/pocillo de TMB+ (Dako) y se hizo reaccionar la mezcla de manera cromogénica durante 20 minutos. Posteriormente, a cada pocillo se le añadieron 20  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1 M para extinguir la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm usando un dispositivo Infinite M1000 (Tecan Trading AG).

Los resultados se muestran en la figura 5. La tabla 6 también muestra resultados de concentración inhibitoria al 50%  $CI_{50}$  ( $\mu$ g/ml) calculada de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A sobre la reacción antígeno-anticuerpo para anticuerpos. Por consiguiente, los anticuerpos humanizados (humanizado 1 y humanizado 2), el anticuerpo quimérico de ave-humano y el anticuerpo quimérico de ave-ratón eran casi comparables en cuanto a la afinidad y, por tanto, no se observó que los anticuerpos humanizados tuvieran cambios significativos en cuanto a la afinidad.

[Tabla 6]

| Anticuerpos derivados de clon n.º 4-2                  | $CI_{50}$ ( $\mu$ g/ml)    |                              |
|--------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
|                                                        | Antígeno de Sema 3A humana | Antígeno de Sema 3A de ratón |
| Anticuerpo humanizado (humanizado 1)                   | 0,071                      | 0,120                        |
| Anticuerpo humanizado (humanizado 2)                   | 0,101                      | 0,157                        |
| Anticuerpo quimérico de ave-humano                     | 0,054                      | 0,112                        |
| Anticuerpo quimérico de ave-ratón                      | 0,074                      | 0,147                        |
| Anticuerpo de ave-ratón CL18M(+)<br>(control negativo) | N.D.                       | N.D.                         |

#### Ejemplo 7: medición de la afinidad frente a antígeno 2

Se evaluaron el anticuerpo quimérico de ave-ratón derivado de clon n.º 4-2 obtenido en el ejemplo 1, los anticuerpos humanizados (humanizado 1 y humanizado 2) obtenidos en el ejemplo 2 y el anticuerpo quimérico de ave-humano para determinar la afinidad frente al antígeno usando BIACORE (GE Healthcare). Las condiciones particulares fueron de la siguiente manera.

Se activó un chip sensor CM5 (GE Healthcare) con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) y después se hizo reaccionar con proteína A (NACALAI TESQUE, INC.) diluida hasta 50  $\mu$ g/ml con Acetate 5.0 (GE Healthcare), es decir, se sometió a reacción de acoplamiento de amina. Se hicieron reaccionar los anticuerpos a concentraciones de cantidad de captura de aproximadamente 200 UR, con los que se hicieron reaccionar antígenos (proteína Sema 3A de ratón y humana) a una concentración de 100 nM, 50 nM,

25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM o 3,125 nM. El tiempo de asociación fue de 3 minutos y el tiempo de disociación fue de 4 minutos, reacción a partir de la cual se analizó el sensograma obtenido mediante modelo de unión de Langmuir (BIAevaluation versión 4.1) (GE Healthcare) para calcular KD (constante de disociación).

Por consiguiente, los valores de KD para Sema 3A humana fueron de 3-4 nM para los anticuerpos humanizados (humanizado 1 y humanizado 2), 14-15 nM para el anticuerpo quimérico de ave-humano y el anticuerpo quimérico de ave-ratón. Los valores de KD para Sema 3A de ratón también fueron de 4-5 nM para los anticuerpos humanizados (humanizado 1 y humanizado 2), 17-18 nM para el anticuerpo quimérico de ave-humano y el anticuerpo quimérico de ave-ratón. Ambos anticuerpos humanizados de humanizado 1 y humanizado 2 tenían valores de KD bajos para Sema 3A en comparación con los de los anticuerpos quiméricos, lo que sugiere mejora de la afinidad mediante humanización.

Ejemplo 8: medición de Sema 3A humana mediante ELISA de tipo sándwich

Con el uso de los anticuerpos anti-Sema 3A obtenidos en los ejemplos 2-4, se midió Sema 3A humana mediante ELISA de tipo sándwich. Las condiciones particulares fueron de la siguiente manera.

En primer lugar, se diluyeron 1:2000 los anticuerpos de captura mostrados en la tabla 7, los cuales se dispensaron a una placa de 384 pocillos Maxi Sorp (Nunc) para reaccionar durante la noche a 4°C con el fin de recubrir la placa con los anticuerpos de captura. Tras la reacción, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,2), a los que se añadieron 45 µl de disolución de bloqueo (PBS que contiene albúmina de suero bovino al 1%, pH 7,2) y se hizo reaccionar la mezcla durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la placa tres veces con una disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,2), a lo que se añadieron 20 µl de anticuerpos y se hizo reaccionar la mezcla durante una hora. Después, se añadieron muestras de prueba en una cantidad de 25 µl a cada pocillo y se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora. Obsérvese que para la muestra de prueba, se usó un diluyente en el que se diluyó en serie proteína quimérica de Sema 3A humana-Fc recombinante (R&D Systems, n.º 1250-S3-02J) con PBS o un diluyente en el que se diluyó en serie proteína quimérica de Sema 3A humana-Fc recombinante (R&D Systems, n.º 1250-S3-02J) con suero humano tipo AB (Sigma-Aldrich Japan, n.º H4522) diluido cinco veces con PBS. Posteriormente, se lavaron los pocillos tres veces con una disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,2), a cada uno de tales pocillos se les añadieron 25 µl de un anticuerpo primario mostrado en la tabla 7 (diluido con PBS que contiene albúmina de suero bovino al 1% (pH 7,2), a una concentración de 0,1 µg/ml) y se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó el producto resultante cinco veces con una disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,2) y después se llevaron a cabo la reacción y detección de un anticuerpo secundario mediante los siguientes métodos.

(Casos de las condiciones 1, 2 y 5-8)

Se añadió anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (GE n.º NA931; diluido 1:1000 con PBS que contiene albúmina de suero bovino al 1% (pH 7,2)) en una cantidad de 25 µl a cada pocillo y se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora, seguido por lavado cinco veces con una disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,2). Posteriormente, a cada pocillo se le añadieron 20 µl de TMB (Dako, n.º S1599) y se hizo reaccionar la mezcla de manera cromogénica durante 20 minutos, a lo que se añadieron 20 µl de ácido sulfúrico 1 N para extinguir la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm usando un dispositivo Infinite M1000 (Tecan Trading AG).

(Casos de las condiciones 3 y 4)

Se añadió anticuerpo de ratón anti-IgM de ave marcado con biotina (BeckmanCoulter Inc. n.º 733087; diluido 1:20000 con PBS que contiene albúmina de suero bovino al 1% (pH 7,2)) en una cantidad de 25 µl a cada pocillo y se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora, seguido por lavado cinco veces con una disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,2). Posteriormente, se añadió estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (HRP) (Thermo Fisher Scientific K.K. 21130; diluida 10000 veces con PBS que contiene albúmina de suero bovino al 1% (pH 7,2)) en una cantidad de 25 µl a cada pocillo y se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora, seguido por lavado cinco veces con una disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,2). Posteriormente, se añadieron 20 µl de TMB (Dako, n.º S1599) a cada pocillo y se hizo reaccionar la mezcla de manera cromogénica durante 20 minutos, a lo cual se añadieron 20 µl de ácido sulfúrico 1 N para extinguir la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm usando un dispositivo Infinite M1000 (Tecan Trading AG).

(Caso de la condición 9)

Se añadió anticuerpo anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Bethyl Laboratories, Inc. n.º A50; diluido 1:10000 con PBS que contiene albúmina de suero bovino al 1% (pH 7,2)) en una cantidad de 25 µl a cada pocillo y se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora, seguido por lavado cinco veces con

una disolución de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,2). Posteriormente, se añadieron 20 µl de TMB (Dako, n.º S1599) a cada pocillo y se hizo reaccionar la mezcla de manera cromogénica durante 20 minutos, a lo cual se añadieron 20 µl de ácido sulfúrico 1 N para extinguir la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm usando un dispositivo Infinite M1000 (Tecan Trading AG).

5 Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7 y las figuras 6 y 7. Obsérvese que la figura 6 muestra una relación de antígeno (Sema 3A) y DO450 (absorbancia a 450 nm) obtenida midiendo muestras de prueba que no contienen suero en las condiciones 1 a 4 y 8. La figura 7 también muestra una relación de antígeno (Sema 3A) y DO450 (absorbancia a 450 nm) obtenida midiendo muestras de prueba que contienen suero en las condiciones 1 y 2. Estos resultados muestran aparentemente que el uso de anticuerpos anti-Sema 3A obtenido en los ejemplos 1 a 4  
10 permite medir Sema 3A mediante ELISA. En el caso en el que se usó el anticuerpo humanizado (humanizado 2) obtenido en el ejemplo 2 como anticuerpo de captura y se usaron los anticuerpos quiméricos de de ave-ratón (derivados de cepa de clon n.º 165 y cepa de clon n.º 582) obtenidos en el ejemplo 3 como anticuerpos primarios (condiciones 1 y 2), también pudo medirse Sema 3A en suero de una manera altamente precisa, con lo cual se  
15 encontró que puede medirse Sema 3A en un analito derivado de una entidad biológica. Por otro lado, en el caso en el que se usó anticuerpo anti-Sema 3A comercialmente disponible (condición 9), no pudo detectarse Sema 3A.

[Tabla 7]

|             | Condiciones de prueba                                                                                      | Anticuerpos primarios                                                                               | Resultados de prueba                   |                                                   |                                                |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|             |                                                                                                            |                                                                                                     | Muestras de prueba<br>libres de suero) | Muestras de prueba (casos<br>que contienen suero) | Muestras de prueba (casos que contienen suero) |
|             |                                                                                                            |                                                                                                     | Resultados                             | Absorbancia a<br>450 nm de Sema<br>3A de 1 µM     | Absorbancia a 450 nm de<br>Sema 3A de 1 µM     |
| Condición 1 | Anticuerpo humanizado<br>obtenido en el ejemplo 2<br>(humanizado 2)                                        | Anticuerpo quimérico de ave-ratón<br>obtenido en el ejemplo 3 (derivado<br>de cepa de clon n.º 166) | Defectable                             | 0,706                                             | Defectable                                     |
| Condición 2 | Anticuerpo humanizado<br>obtenido en el ejemplo 2<br>(humanizado 2)                                        | Anticuerpo quimérico de ave-ratón<br>obtenido en el ejemplo 3 (derivado<br>de cepa de clon n.º 582) | Defectable                             | 1,799                                             | Defectable                                     |
| Condición 3 | Anticuerpo humanizado<br>obtenido en el ejemplo 2<br>(humanizado 2)                                        | Anticuerpo de ave obtenido en el<br>ejemplo 4 (derivado de cepa de clon<br>n.º 240-40)              | Defectable                             | 0,191                                             | No realizado                                   |
| Condición 4 | Anticuerpo humanizado<br>obtenido en el ejemplo 2<br>(humanizado 2)                                        | Anticuerpo de ave obtenido en el<br>ejemplo 4 (derivado de cepa de clon<br>n.º 255-72)              | Defectable                             | 0,174                                             | No realizado                                   |
| Condición 5 | Anticuerpo de ave obtenido<br>en el ejemplo 4 (derivado<br>de cepa de clon n.º 240-<br>40)                 | Anticuerpo quimérico de ave-ratón<br>obtenido en el ejemplo 1 (derivado<br>de cepa de clon n.º 4-2) | Defectable                             | 3,403                                             | No realizado                                   |
| Condición 6 | Anticuerpo de ave obtenido<br>en el ejemplo 4 (derivado<br>de cepa de clon n.º 255-<br>72)                 | Anticuerpo quimérico de ave-ratón<br>obtenido en el ejemplo 1 (derivado<br>de cepa de clon n.º 4-2) | Defectable                             | 2,916                                             | No realizado                                   |
| Condición 7 | Anticuerpo quimérico de<br>ave-humano obtenido en el<br>ejemplo 4 (derivado de<br>cepa de clon n.º 240-40) | Anticuerpo quimérico de ave-ratón<br>obtenido en el ejemplo 1 (derivado<br>de cepa de clon n.º 4-2) | Defectable                             | 3,288                                             | No realizado                                   |
| Condición 8 | Anticuerpo quimérico de<br>ave-humano obtenido en el<br>ejemplo 4 (derivado de<br>cepa de clon n.º 255-72) | Anticuerpo quimérico de ave-ratón<br>obtenido en el ejemplo 1 (derivado<br>de cepa de clon n.º 4-2) | Defectable                             | 1,889                                             | No realizado                                   |
| Condición 9 | Anticuerpo humanizado<br>obtenido en el ejemplo 2<br>(humanizado 2)                                        | IgG policlonal de cabra anti-Sema<br>3A (producto comercializado)                                   | Indetectable                           | -                                                 | No realizado                                   |

## Ejemplo 9: ensayo de colapso 1

## 1) Método de prueba

Se aisló ganglio de raíz dorsal (DRG) de embriones de pollo de día 7 a partir de un pollo. Se sometió el DRG aislado a cultivo estacionario en una placa de 24 pocillos recubierta con PLL y laminina que contiene 250 µl de medio que contiene NGF a 37°C durante de 16 a 20 horas, a partir de lo cual se observó la elongación de neuronas de DRG sensibles a NGF. Aparte de esto, una disolución mezclada de proteína Sema 3A derivada de pollo (3 nM) y el anticuerpo de ave anti-Sema 3A obtenido en el ejemplo 1 (sobrenadante de cultivo) (a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml) o anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A (10 µg/ml) se incubó previamente sobre hielo durante 30 minutos. Se añadió la disolución mezclada a la placa de 24 pocillos para proporcionar 0, 0,1 ó 0,3 nM de la concentración final de la proteína Sema 3A derivada de pollo y se sometió la disolución mezclada a cultivo estacionario a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se inmovilizaron las neuronas con una disolución de formalina al 3,7%, y el cono de crecimiento, que se formó en el extremo de axones de las neuronas en cultivo, se visualizó con faloidina conjugada con Alexa488. Se determinó mediante microscopía de fluorescencia la tasa (%) de neuronas con conos de crecimiento colapsados con respecto a las neuronas de DRG sensibles a NGF totales. También se usó anticuerpo anti-IgG de conejo o IgG de ratón como control en lugar de anticuerpo de ave anti-Sema 3A o anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A y se llevó a cabo el ensayo de colapso de la misma manera tal como se describió anteriormente.

## 2) Resultados

La figura 8 muestra resultados de ensayo de colapso con anticuerpo de ave anti-Sema 3A y la figura 9 muestra resultados de ensayo de colapso con anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A. Tal como se muestra aparentemente en las figuras 8 y 9, se observa que el anticuerpo de ave anti-Sema 3A y el anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A tienen la acción de suprimir el colapso de cono de crecimiento mediante proteína Sema 3A. Es decir, se revela que el anticuerpo anti-Sema 3A que contiene las CDR 1 a 3 que tienen secuencias de aminoácidos específicas puede suprimir eficazmente la capacidad de inducción de colapso de cono de crecimiento mediante proteína Sema 3A.

## Ejemplo 10: ensayo de colapso 2

## 1) Método de prueba

Se llevó a cabo el ensayo de colapso en el mismo procedimiento que en el ejemplo 9 excepto porque se usó proteína Sema 3A derivada de humano en lugar de proteína Sema 3A derivada de pollo.

## 2) Resultados

La figura 10 muestra resultados de ensayo de colapso con anticuerpo de ave anti-Sema 3A. Tal como se muestra en la figura 10, el anticuerpo de ave anti-Sema 3A pudo suprimir eficazmente una función de la proteína Sema 3A derivada de humano para suprimir así el colapso de cono de crecimiento. Es decir, se revela que el anticuerpo anti-Sema 3A que contiene las CDR 1 a 3 que tienen secuencias de aminoácidos específicas también puede suprimir eficazmente la capacidad de inducción de colapso de cono de crecimiento mediante proteína Sema 3A en humano.

## Ejemplo 11: ensayo de colapso 3

## 1) Método de prueba

Se aisló ganglio de raíz dorsal (DRG) de embriones de pollo de día 7 a partir de un pollo. Se sometió el DRG aislado a cultivo estacionario en una placa de 24 pocillos recubierta con PLL y laminina que contiene 250 µl de medio que contiene NGF a 37°C durante de 16 a 20 horas, a partir de lo cual se observó la elongación de neuronas de DRG sensibles a NGF. Aparte de esto, una disolución mezclada de proteína Sema 3A derivada de humano (3 nM) y el anticuerpo humanizado anti-Sema 3A obtenido en el ejemplo 2 (humanizado 2) (sobrenadante de cultivo) (a una concentración de anticuerpo de 100 µg/ml) se incubó previamente sobre hielo durante 30 minutos. Se añadió la disolución mezclada a la placa de 24 pocillos para proporcionar 0, 0,05, 0,1 ó 0,3 nM de la concentración final de la proteína Sema 3A derivada de humano y se sometió la disolución mezclada a cultivo estacionario a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se inmovilizaron las neuronas con una disolución de formalina al 3,7%, y el cono de crecimiento, que se formó en el extremo de axones de las neuronas en cultivo, se visualizó con faloidina conjugada con Alexa488. Se determinó mediante microscopía de fluorescencia la tasa (%) de neuronas con conos de crecimiento colapsados con respecto a las neuronas de DRG sensibles a NGF totales. Se usó IgG-lambda humana como control en lugar de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A y se llevó a cabo el ensayo de colapso de la misma manera tal como se describió anteriormente.

## 2) Resultados

La figura 11 muestra resultados de ensayo de colapso con anticuerpo humanizado anti-Sema 3A. Tal como se muestra aparentemente en la figura 11, se observa que el anticuerpo humanizado anti-Sema 3A tiene la acción de suprimir el colapso de cono de crecimiento mediante proteína Sema 3A. Es decir, se revela que el anticuerpo anti-Sema 3A que contiene las CDR 1 a 3 que tienen secuencias de aminoácidos específicas puede suprimir eficazmente la capacidad de inducción de colapso de cono de crecimiento mediante proteína Sema 3A también en el caso de estar humanizado.

Ejemplo 12: ensayo de unión a Sema 3A humana

#### 1) Método de prueba

Se prepararon células COS-7 de tipo natural o células COS-7 transformadas para expresar NRP1 (neurofilina 1) fusionada a EGFP (proteína verde fluorescente potenciada). Aparte de esto, medio DMEM que contiene proteína Sema 3A derivada de humano conjugada con fosfatasa alcalina (0,1 nM) y el anticuerpo de ave anti-Sema 3A obtenido en el ejemplo 1 (sobrenadante de cultivo) (a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml) o el anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A (10 µg/ml) se incubó previamente sobre hielo durante 30 minutos, 500 µl de lo cual se añadieron a células COS-7 de tipo natural o células COS-7 que expresan NRP1 que se bloquearon previamente con tampón de HBH (solución salina equilibrada de Hanks que contiene HEPES de sodio 20 mM, pH 7,00, BSA al 0,05% en volumen y FBS al 10% en volumen) y se dejó reposar la mezcla sobre hielo durante una hora. Posteriormente, se lavaron las células cuatro veces con tampón de HBH y después se inmovilizaron con formaldehído al 4%. Se lavaron las células inmovilizadas una vez con tampón de HH (solución salina equilibrada de Hanks que contiene HEPES de sodio 20 mM, pH 7,00), al que después se añadieron 500 µl de sustrato de fosfatasa alcalina (NBT/BCIP: cloruro de nitro-azul de tetrazolio/sal de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato) y se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente, se observaron las células para determinar un grado de reacción cromogénica usando microscopía. Se llevó a cabo un ensayo de control en el mismo procedimiento tal como se describió anteriormente excepto porque no se añadió proteína Sema 3A derivada de humano que se une a fosfatasa alcalina, o se usó IgG de conejo en lugar de anticuerpo de ave anti-Sema 3A o anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A. Obsérvese que se confirma que las células COS-7 que expresan NRP1 usadas en la prueba no tienen ninguna variación del nivel de expresión de NRP1 basándose en la intensidad de fluorescencia de EGFP a partir de las células.

#### 2) Resultados

La figura 12 muestra resultados de ensayo de unión con anticuerpo de ave anti-Sema 3A y la figura 13 muestra resultados de ensayo de unión con anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A. Tal como se muestra aparentemente en las figuras 12 y 13, en el caso de la adición de la mezcla de anticuerpo de ave anti-Sema 3A o anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A y proteína Sema 3A humana, se inhibió la unión de proteína Sema 3A derivada de humano a células COS-7 que expresan NRP1. Es decir, los resultados revelan que el anticuerpo anti-Sema 3A que contiene las CDR 1 a 3 que tienen secuencias de aminoácidos específicas se une a proteína Sema 3A derivada de humano y puede inhibir la unión de proteína Sema 3A derivada de humano y NRP1.

Ejemplo 13: ensayo de unión a Sema 3F humana

#### 1) Método de prueba

Se llevó a cabo el ensayo de unión en el mismo procedimiento que en el ejemplo 12 excepto por el uso de células COS-7 transformadas para expresar NRP2 (neuropilina-2) (células COS-7 que expresan NRP2) fusionada a EGFP en lugar de células COS-7 que expresan NRP1 y de proteína Sema 3F derivada de humano conjugada con fosfatasa alcalina en lugar de proteína Sema 3A derivada de humano conjugada con fosfatasa alcalina.

#### 2) Resultados

La figura 14 muestra resultados de ensayo de unión con anticuerpo de ave anti-Sema 3A. Tal como se muestra aparentemente en la figura 14, incluso en el caso de la adición de una mezcla de anticuerpo de ave anti-Sema 3A y proteína Sema 3F derivada de humano, no se inhibió la unión de proteína Sema 3F derivada de humano a células COS-7 que expresan NRP2. Es decir, los resultados revelan que el anticuerpo anti-Sema 3A que contiene las CDR 1 a 3 que tienen secuencias de aminoácidos específicas no se une a proteína Sema 3F que es una molécula de subfamilia que tiene alta homología con la proteína Sema 3A, lo que sugiere la posibilidad de unión específica a proteína Sema 3A.

Ejemplo 14: análisis de la influencia del anticuerpo anti-Sema 3A sobre la función cognitiva

#### 1) Materiales de prueba

1-1) Aβ (25-35) y Aβ (35-25)

Se prepararon A $\beta$  (25-35) (proteína amiloide  $\beta$  (25-35)) (Bachem, n.º H-1192) y A $\beta$  (35-25) (proteína amiloide  $\beta$  (35-25)) (Bachem, n.º H-2964) con agua destilada a 1 mg/ml y después se incubaron a 37°C durante 4 días para preparar una disolución de A $\beta$  (25-35) y una disolución de A $\beta$  (35-25). Mediante este procedimiento, A $\beta$  (25-35) se agrega y logra citotoxicidad celular. Por otro lado, A $\beta$  (35-25) es un A $\beta$  inactivado que tiene la secuencia de aminoácidos inversa de A $\beta$  25-35 activado y no muestra citotoxicidad celular ni siquiera tras el procedimiento. Se usó A $\beta$  (35-25) como control negativo.

#### 1-2) Anticuerpo anti-Sema 3A

Se preparó el anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A producido en el ejemplo 1 con solución salina fisiológica a 1 mg/ml para preparar una disolución de anticuerpo anti-Sema 3A.

#### 1-4) IgG normal

Para una disolución de IgG normal, se usó 1 mg/ml de IgG de ratón normal (obtenida de Calbiochem).

#### 1-5) Ratón

Se usaron ratones (C57BL/6J) de 3 semanas de edad adquiridos de CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.

#### 2) Método de prueba

Se llevó a cabo una tarea de reconocimiento de nuevo objeto (NORT) según el siguiente método.

En primer lugar, se prepararon ratones de 3 semanas de edad y se aclimataron a un investigador mediante manipulación de tal manera que los ratones se pusieron en la mano del investigador durante 10 minutos al día durante 2 semanas. En segundo lugar, se dividieron los ratones en 5 grupos mostrados en la tabla 8 y se les administró, por vía intracerebroventricular, A $\beta$  y un anticuerpo en las condiciones mostradas en la tabla 8. Estas disoluciones se administraron a 1 mm justo por debajo del bregma. Se llevó a cabo la administración usando una microjeringa equipada con un tubo de teflón (Eicom Corporation) conectado a la punta de aguja de la jeringa y una aguja de inyección 27G (TERUMO CORPORATION) doblada en forma de L a 3,3 mm de la punta de la aguja e insertada en la punta del tubo.

[Tabla 8]

| Grupo                                                                  | Condiciones de administración                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grupo intacto (N=24)                                                   | No tratado (no tratado con A $\beta$ ni anticuerpo)                                                                                     |
| Grupo tratado con A $\beta$ (35-25) (N=34)                             | Administración ICV de disolución de A $\beta$ (35-25) de 3 $\mu$ l                                                                      |
| Grupo tratado con A $\beta$ (25-35) (N=43)                             | Administración ICV de disolución de A $\beta$ (25-35) de 3 $\mu$ l                                                                      |
| Grupo tratado con A $\beta$ (25-35) + IgG normal (N=22)                | Administración ICV de disolución de A $\beta$ (25-35) de 3 $\mu$ l y disolución de IgG normal de 3 $\mu$ l al mismo tiempo              |
| Grupo tratado con A $\beta$ (25-35) + anticuerpo anti-Sema 3A (N = 22) | Administración ICV de disolución de A $\beta$ (25-35) de 3 $\mu$ l y disolución de anticuerpo anti-Sema 3A de 3 $\mu$ l al mismo tiempo |

3 días tras la administración intracerebroventricular, se transfirieron los ratones a una jaula de prueba con 35 cm x 35 cm x 35 cm y se aclimataron en la jaula de prueba durante 10 minutos. Al día siguiente (día 4 tras la administración), se colocaron objetos A y B en posiciones dadas en la jaula de prueba y se midió la cantidad de tiempo para acceder a cada uno de los objetos durante 10 minutos (ensayo de adquisición). En este momento, se midió una cantidad de tiempo para acceder dentro de una distancia de 1 cm o menos entre el objeto y la nariz del ratón como tiempo de acceso. Al día siguiente (día 5 tras la administración), se midió una cantidad de tiempo de acceso a cada uno del objeto A y un nuevo objeto C en lugar del objeto B durante 10 minutos (ensayo de prueba).

Obsérvese que para los objetos A, B y C, se usaron unos con formas y colores diferentes. Los objetos A, B y C tienen particularmente las siguientes formas y colores.

Objeto A: una forma compuesta por una porción de base (verde) estirada horizontalmente y una porción de extensión (verde) estirada verticalmente desde el centro de la porción de base y dotada de una forma de T en vista frontal. Las porciones de base y de extensión tienen cada una forma de cuboide.

Objeto B: la misma forma que el objeto A excepto porque el color de la porción de base es amarillo y la porción de extensión es en forma de columna y su color es rojo.

Objeto C: la misma forma que el objeto A excepto porque el color de la porción de base es amarillo y la porción de extensión está recortada en forma de arco de círculo en vista frontal lateral y es amarilla.

Se colocaron los objetos A, B y C de tal manera que sus porciones de base estaban en contacto con el fondo de la jaula de prueba y sus porciones de extensión estaban estiradas hacia arriba.

### 5 3) Análisis estadístico

En el ensayo de adquisición, se calculó la tasa de tiempo de acceso al objeto B con respecto al tiempo de acceso total a los objetos A y B (tasa de acceso al objeto B). Cuando se llevó a cabo el ensayo de adquisición, los objetos A y B eran objetos desconocidos y, por tanto, se esperaba que la cantidad de tiempo de acceso a cada uno de ellos estuviera a niveles comparables. Cuando la cantidad de tiempo de acceso a cada uno de ellos era desproporcionalmente alta en cualquiera de ellos, la función cognitiva, etc., estaba posiblemente alterada debido a la administración de fármaco y, por tanto, se consideró que una estimación era imposible en el experimento. En el ensayo de prueba, se calculó la tasa de tiempo de acceso al objeto C con respecto al tiempo de acceso total a los objetos A y C (tasa de acceso al objeto C). Cuando se llevó a cabo el ensayo de prueba, sólo el objeto C era un objeto desconocido y, por tanto, se esperaba una cantidad de tiempo de acceso al objeto C desproporcionada cuando se adquirió memoria del objeto A. Tal como se describió anteriormente, las tasas de acceso al objeto B y al objeto C calculadas se sometieron cada una de ellas a análisis estadístico usando análisis de varianza de un factor. Se realizó la comparación entre grupos mediante la prueba de Tukey-Kramer HSD.

### 20 4) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 15A (ensayo de adquisición) y 15B (ensayo de prueba).

Tal como se muestra aparentemente en la figura 15A, las tasas de acceso al objeto B en todos los grupos fueron sustancialmente de aproximadamente el 50% en el ensayo de adquisición y no se observaron diferencias significativas entre todos los grupos. Por tanto, no se observó alteración de la función cognitiva, lo que sugiere que la estimación de adquisición de memoria en el experimento era posible. Por otro lado, tal como se muestra en la figura 15B, el grupo intacto y el grupo tratado con A $\beta$  (35-25) (control negativo) tuvieron cada uno aproximadamente el 75% de tasa de acceso al objeto C en el ensayo de prueba. Sin embargo, el grupo tratado con A $\beta$  (25-35) sólo tuvo aproximadamente el 50% de tasa de acceso al objeto C, dando como resultado una disminución significativa de preferencia al objeto C en comparación con el grupo intacto ( $p < 0,0001$ , frente al grupo intacto). Los resultados revelan que no se adquirió memoria del objeto A debido a alteración de la memoria provocada por la administración de A $\beta$  (25-35).

Además, tal como se muestra aparentemente en la figura 15B, el grupo tratado con A $\beta$  (25-35) + anticuerpo anti-Sema 3A tuvo aproximadamente el 75% de tasa de acceso al objeto C, dando como resultado una recuperación significativa en comparación con el grupo tratado con A $\beta$  (25-35) y el grupo tratado con A $\beta$  (25-35) + IgG normal ( $p < 0,0001$ , frente al grupo tratado con A $\beta$  (25-35) o al grupo tratado con A $\beta$  (25-35) + IgG normal).

Estos resultados demuestran que el anticuerpo anti-Sema 3A que contiene CDR que tienen secuencias de aminoácidos específicas muestra efectos para inhibir la inducción de alteración de memoria inducida con A $\beta$ . Ya se ha observado un nivel de expresión aumentado de proteína Sema 3A en el cerebro cadavérico en un paciente con enfermedad de Alzheimer, y se sabe que la proteína mediadora de respuesta de colapsina (CRMP), que se modifica por fosfato en la ruta de señalización de Sema 3A, es CRMP altamente modificada con fosfato en ovillo neurofibrilar, una lesión de enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, se considera que tal eficacia farmacológica se debe al bloqueo de la señal Sema 3A-CRMP mediante el anticuerpo anti-Sema 3A.

Ejemplo 15: análisis de efectos del anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A sobre enfermedades inmunitarias/inflamatorias

Se analizaron los efectos del anticuerpo quimérico de ave-ratón obtenido en el ejemplo 2 sobre el estado inflamatorio mortal en un modelo con inoculación de lipopolisacárido, un modelo de estado séptico simulado.

#### 55 1) Materiales de prueba

##### 1-1) Lipopolisacárido

Se preparó lipopolisacárido (denominado a continuación en el presente documento LPS, Sigma-Aldrich Japan, lote n.º: 032M4082V) con solución salina fisiológica a 6 mg/ml.

##### 1-2) Anticuerpo de ave-ratón anti-Sema 3A

Se diluyó el anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A producido en el ejemplo 2 con solución salina fisiológica a 5 mg/ml, que se usó como disolución de anticuerpo anti-Sema 3A.

## 1-3) Anticuerpo quimérico para control negativo

Se diluyó anticuerpo quimérico de ave-ratón (IgG) no específico (anticuerpo quimérico para control negativo), que se produjo usando una biblioteca de anticuerpos construida mediante células DT40 derivadas de células B de pollo, con solución salina fisiológica a 5 mg/ml, que se usó como una disolución de anticuerpo quimérico para control negativo.

## 1-4) Ratón

Se usaron ratones macho de 6 semanas de edad (C57BL/6J) adquiridos de CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.

## 2) Método de prueba

Tras adquirirse, se acondicionaron ratones C57BL/6J en una sala de cría de ratones y se dividieron en 5 ratones por grupo y, entre ellos, se estableció un grupo de prueba tal como se muestra en la tabla 9. Se administraron anticuerpos por la vena de la cola y, tras 30 minutos, se inoculó LPS por vía intraperitoneal. El día en el que se llevaron a cabo estos tratamientos se estableció como día 0 y se observó si cada ratón estaba vivo o muerto hasta el día 4, lo cual se usó como indicador de determinación de la eficacia. Se llevó a cabo la misma prueba un total de tres veces para confirmar la reproducibilidad.

Tras confirmarse que tres pruebas no eran disociativas, se combinaron los resultados obtenidos a partir de estas pruebas, basándose en lo cual se determinaron efectos de mejora de la tasa de supervivencia y su eficacia en el día 4. Se usó el método de Kaplan-Meier para preparar la curva de supervivencia, basándose en lo cual se determinaron efectos de prolongación del periodo de supervivencia.

[Tabla 9]

| Grupo                                                                    | Condiciones de administración                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grupo de control negativo (N=5)                                          | Se administró disolución de anticuerpo quimérico para control negativo en una cantidad de 0,1 ml (500 µg de dosis de anticuerpo quimérico para control negativo) por la vena de la cola y, tras 30 minutos, se inoculó LPS por vía intraperitoneal a 60 mg/kg de dosis. |
| Grupo tratado con anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A (N = 5) | Se administró disolución de anticuerpo anti-Sema 3A en una cantidad de 0,1 ml (500 µg de dosis de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A) por la vena de la cola y, tras 30 minutos, se inoculó LPS por vía intraperitoneal a 60 mg/kg de dosis.                |

## 3) Análisis estadístico

En el caso de morir antes del día 4 tras la administración, no se confirmó la prolongación del periodo de supervivencia (no eficaz) y en el caso de estar vivo hasta el día 4, se confirmó la prolongación del periodo de supervivencia (eficaz). A partir de estos valores binarizados, se determinó la sistematicidad entre las tres pruebas mediante prueba de Breslow-Day y después se determinó la tasa de diferencia de eficacia obtenida combinando las tres pruebas mediante prueba de Cochran-Mantel-Haenzel. Se realizó una prueba de rangos logarítmicos para determinar efectos de la prolongación del periodo de supervivencia.

## 4) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10. Tal como se muestra aparentemente en la tabla 10, en las tres pruebas, la tasa de supervivencia del grupo tratado con anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A fue superior a la del grupo tratado con anticuerpo quimérico de secuencia no específica, un control negativo. La prueba de Bresslow-Day, que se realizó para la confirmación de la capacidad de no disociación entre estas pruebas, no indica significación y, por tanto, se confirma que las tres pruebas no son disociativas ( $p = 0,6202$ ). Basándose en esto, se combinaron los resultados de las tres pruebas, basándose en lo cual, se realizó una prueba de Cochran-Mantel-Haenzel y, además de  $P = 0,0364$ , se observa diferencia de significación estadística a un nivel de significación del 5% en la tasa de supervivencia entre el grupo de control negativo y el grupo de anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A. Estos resultados revelan que el anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A muestra efectos para mejorar la tasa de supervivencia de animales de modelo con estado inflamatorio mortal y los efectos indican reproducibilidad.

[Tabla 10]

|          | Grupo                      | Número de ratones | Muertos | Vivos | Tasa de supervivencia |
|----------|----------------------------|-------------------|---------|-------|-----------------------|
| Prueba I | Control negativo           | N=5               | 3       | 2     | 40%                   |
|          | Anticuerpo quimérico anti- | N=5               | 2       | 3     | 60%                   |

|                         |                                   |      |    |    |       |
|-------------------------|-----------------------------------|------|----|----|-------|
|                         | Sema 3A                           |      |    |    |       |
| Prueba II               | Control negativo                  | N=5  | 4  | 1  | 20%   |
|                         | Anticuerpo quimérico anti-Sema 3A | N=5  | 1  | 4  | 80%   |
| Prueba III              | Control negativo                  | N=5  | 4  | 1  | 20%   |
|                         | Anticuerpo quimérico anti-Sema 3A | N=5  | 2  | 3  | 60%   |
| Tres pruebas combinadas | Control negativo                  | N=15 | 11 | 4  | 26,7% |
|                         | Anticuerpo quimérico anti-Sema 3A | N=15 | 5  | 10 | 66,7% |

La curva de supervivencia de las tres pruebas combinadas se preparó mediante método de Kaplan-Meier y se realizó una prueba de rangos logarítmicos para determinar la significación. Los resultados se muestran en la figura 16. Tal como se muestra en la figura 16, el análisis de la prolongación del periodo de supervivencia también indica significación, es decir  $p = 0,0115$ , y revela que el anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A muestra efectos de prolongación del periodo de supervivencia.

Ejemplo 16: análisis del efecto del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre enfermedades inmunitarias/inflamatorias

También se analizaron los efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A obtenido en el ejemplo 2 sobre modelo de enfermedad inflamatoria inducida por LPS de la misma manera que en el ejemplo 12.

#### 1) Materiales de prueba

##### 1-1) LPS

Se llevó a cabo la preparación de LPS de la misma manera que en el ejemplo 15.

##### 1-2) Anticuerpo humanizado anti-Sema 3A

Se diluyó anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) producido en el ejemplo 2 con solución salina fisiológica para obtener una disolución de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A. En el grupo tratado con 500  $\mu\text{g}$  de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A, se preparó anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) a 5 mg/ml y en el grupo tratado con 100  $\mu\text{g}$  de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A, se preparó anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) a 1 mg/ml, para su uso en el presente documento.

##### 1-3) Anticuerpo humano para control negativo

Se diluyó anticuerpo policlonal humano no específico (control de isotipo policlonal de IgG humano; BioXCell, n.º BE0092) con solución salina fisiológica hasta 5 mg/ml, lo cual se usó como disolución de anticuerpo humano para control negativo.

##### 1-4) Ratón

Se usaron ratones macho de 6 semanas de edad (C57BL/6J) adquiridos de CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.

#### 2) Método de prueba

Tras adquirirse, se acondicionaron los ratones C57BL/6J en una sala de cría de ratones y se dividieron en 10 ratones por grupo y, entre ellos, se establecieron grupos de prueba tal como se muestra en la tabla 11. Se administraron anticuerpos por la vena de la cola y, tras 30 minutos, se inoculó LPS por vía intraperitoneal. El día en el que se llevaron a cabo estos tratamientos se estableció como día 0 y se observó si cada ratón estaba vivo o muerto hasta el día 4, lo cual se usó como indicador de determinación de la eficacia.

[Tabla 11]

| Grupo                                                              | Condiciones de administración                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grupo de control negativo (N=10)                                   | Se administró una disolución de anticuerpo humano para control negativo en una cantidad de 0,1 ml (500 $\mu\text{g}$ de dosis de anticuerpo humano para control negativo) por la vena de la cola y, tras 30 minutos, se inoculó LPS por vía intraperitoneal a 60 mg/kg de dosis. |
| Grupo tratado con 100 $\mu\text{g}$ de anticuerpo humanizado anti- | Se administró una disolución de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A en una cantidad de 0,1 ml (100 $\mu\text{g}$ de dosis de anticuerpo humanizado                                                                                                                                |

|                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sema 3A (N = 10)                                                        | anti-Sema 3A) por la vena de la cola y, tras 30 minutos, se inoculó LPS por vía intraperitoneal a 60 mg/kg de dosis.                                                                                                                                        |
| Grupo tratado con 500 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (N = 10) | Se administró una disolución de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A en una cantidad de 0,1 ml (500 µg de dosis de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A) por la vena de la cola y, tras 30 minutos, se inoculó LPS por vía intraperitoneal a 60 mg/kg de dosis. |

### 3) Análisis estadístico

Las tasas de supervivencia binarizadas de valores no eficaces y eficaces de la misma manera que en el ejemplo 12 se sometieron a prueba de Cochran-Armitage de un factor para determinar la reactividad de la dosis con respecto a los efectos de mejora de la tasa de supervivencia, en la que se supusieron los siguientes tres tipos de reactividad de la dosis: tipo de aumento lineal, tipo de saturación de dosis baja y tipo de subida de dosis alta, y se predeterminaron contrastes de estos tipos. Se realizó una prueba de rangos logarítmicos para determinar efectos de la prolongación del periodo de supervivencia.

### 4) Resultados

Las tasas de supervivencia de cada grupo se muestran en la tabla 12. En el grupo tratado con 100 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A, la tasa de supervivencia fue el doble (60%) que en el grupo de control negativo (30%) y en el grupo tratado con 500 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A, se observó que la tasa de supervivencia era superior (80%) a la del grupo tratado con 100 µg. En cada uno de ambos grupos tratados con anticuerpo humanizado anti-Sema 3A, se mejoraron las tasas de supervivencia y se encontró una tendencia dependiente de la dosis.

[Tabla 12]

| Grupo                                                          | Número de ratones | Muertos | Vivos | Tasa de supervivencia |
|----------------------------------------------------------------|-------------------|---------|-------|-----------------------|
| Grupo de control negativo                                      | N=10              | 7       | 3     | 30%                   |
| Grupo tratado con 100 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A | N=10              | 4       | 6     | 60%                   |
| Grupo tratado con 500 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A | N=10              | 2       | 8     | 80%                   |

Estos resultados muestran aparentemente que el anticuerpo humanizado anti-Sema 3A también suprime el estado inflamatorio mortal inducido por LPS y muestra efectos de mejorar la tasa de supervivencia de manera similar al anticuerpo quimérico de ave-ratón anti-Sema 3A mostrado en el ejemplo 15.

Ejemplo 17: análisis de los efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre enfermedades inflamatorias mortales tras la aparición

A partir de los resultados obtenidos en el ejemplo 16, se determinaron efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A en el caso en el que se inoculó LPS antes de la aparición y su tratamiento se realizó tras la aparición.

#### 1) Material de prueba

##### 1-1) LPS

Se llevó a cabo la preparación de LPS de la misma manera que en el ejemplo 15.

##### 1-2) Anticuerpo humanizado anti-Sema 3A

Se diluyó el anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) producido en el ejemplo 2 con solución salina fisiológica para obtener una disolución de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A. En cada uno de los grupos tratados con 500 µg, 250 µg y 125 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A, se preparó anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) a 5, 2,5 y 1,25 mg/ml, respectivamente, para su uso en el presente documento.

##### 1-3) Anticuerpo humano para control negativo

Se preparó una disolución de anticuerpo humano para control negativo de la misma manera que en el ejemplo 16.

##### 1-4) Ratón

Se usaron ratones macho de 6 semanas de edad (C57BL/6J) adquiridos de CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.

## 2) Método de prueba

Tras adquirirse, se acondicionaron los ratones C57BL/6J en una sala de cría de ratones y se dividieron en 10 ratones por grupo y, entre ellos, se establecieron grupos de prueba tal como se muestra en la tabla 13. En la prueba, de manera diferente a los ejemplos 15 y 16, se supuso un uso basado en atención médica real y, por tanto, se realizó la determinación de la eficacia en la administración tras haberse inducido ya el estado inflamatorio. En primer lugar, se inoculó LPS por vía intraperitoneal para inducir reacción inflamatoria. Se administraron anticuerpos por la vena de la cola una hora tras la inoculación intraperitoneal de LPS. El día en el que se realizaron estos tratamientos se estableció como día 0 y se observó si cada ratón estaba vivo o muerto hasta el día 4, lo cual se usó como indicador de determinación de la eficacia.

[Tabla 13]

| Grupo                                                                   | Condiciones de administración                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grupo de control negativo (N=10)                                        | Se inoculó LPS por vía intraperitoneal a 60 mg/kg de dosis y, tras una hora, se administró una disolución de anticuerpo humano para control negativo en una cantidad de 0,1 ml (500 µg de dosis de una disolución de anticuerpo humano para control negativo) por la vena de la cola. |
| Grupo tratado con 125 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (N = 10) | Se inoculó LPS por vía intraperitoneal a 60 mg/kg de dosis y, tras una hora, se administró una disolución de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A en una cantidad de 0,1 ml (125 µg de dosis de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A) por la vena de la cola.                             |
| Grupo tratado con 250 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (N = 10) | Se inoculó LPS por vía intraperitoneal a 60 mg/kg de dosis y, tras una hora, se administró una disolución de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A en una cantidad de 0,1 ml (250 µg de dosis de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A) por la vena de la cola.                             |
| Grupo tratado con 500 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (N = 10) | Se inoculó LPS por vía intraperitoneal a 60 mg/kg de dosis y, tras una hora, se administró una disolución de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A en una cantidad de 0,1 ml (500 µg de dosis de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A) por la vena de la cola.                             |

## 3) Análisis estadístico

En los tipos de reactividad de la dosis que se indicaron por los 4 grupos que contienen grupo de control negativo, se supusieron los siguientes 7 tipos: tipos de (1) regresión lineal de dosis observada, (2) aumento lineal, (3) subida de dosis media, (4) subida de dosis alta, (5) saturación de dosis media, (6) saturación de dosis baja y (7) saturación y subida de dosis media. Se aplicó una prueba de Cochran-Armitage a los 7 patrones de reacción y se calcularon valores de p, que se ajustaron por múltiplos mediante un método de ordenamiento y reextracción, y entre los valores de p calculados, se adoptó un tipo de reactividad de contraste con el menor valor de p como tipo óptimo de reactividad de la dosis. Se realizó una prueba de rangos logarítmicos para determinar efectos de la prolongación del periodo de supervivencia.

## 4) Resultados

Las tasas de supervivencia de cada grupo del día 4 tras la administración se muestran en la tabla 14. En el grupo de control negativo, la tasa de supervivencia fue del 10%, sin embargo, en los grupos respectivos tratados con 125, 250 y 500 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A una hora tras la inoculación de LPS, las tasas de supervivencia fueron del 30, el 40 y el 100%, respectivamente. Por consiguiente, se observó una tendencia en la que la tasa de supervivencia aumenta a medida que aumenta la dosis. En particular, en el grupo tratado con 500 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A, se observaron efectos sorprendentes en los que los 10 ratones estaban vivos.

[Tabla 14]

| Grupo                                                          | Número de ratones | Muertos | Vivos | Tasa de supervivencia |
|----------------------------------------------------------------|-------------------|---------|-------|-----------------------|
| Grupo de control negativo                                      | N=10              | 9       | 1     | 10%                   |
| Grupo tratado con 125 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A | N=10              | 7       | 3     | 30%                   |
| Grupo tratado con 250 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A | N=10              | 6       | 4     | 40%                   |
| Grupo tratado con 500 µg de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A | N=10              | 0       | 10    | 100%                  |

Los 7 tipos de reactividad de la dosis, que se supuso que estaban indicados por las tasas de supervivencia

binarizadas, se predeterminaron y se sometieron a prueba de Cochran-Armitage ajustados por múltiplos mediante un método de ordenamiento y reextracción. Los resultados de los valores de p calculados se muestran en la tabla 15. Obsérvese que se proporcionan multitudes innecesarias de números de dígitos de con el fin de expresar el orden de rango de los valores de p.

[Tabla 15]

| Patrones de reacción a la dosis             | Valores de p ajustados por múltiplos |
|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| Tipo de regresión lineal de dosis observada | 0,00001790                           |
| Tipo de aumento lineal                      | 0,00004540                           |
| Tipo de subida de dosis media               | 0,00005730                           |
| Tipo de subida de dosis alta                | 0,00008040                           |
| Tipo de saturación de dosis media           | 0,00133730                           |
| Tipo de saturación y subida de dosis media  | 0,00252090                           |
| Tipo de saturación de dosis baja            | 0,01135610                           |

Como resultados analíticos, se obtuvieron resultados de que todos los tipos de reacción a la dosis supuestos indicaron significación. El tipo de reacción a la dosis con el menor valor de p fue el tipo de aumento lineal de dosis observado ( $p = 0,00001790$ ), uno con el segundo valor de p más pequeño fue el tipo de aumento lineal ( $p = 0,0000454$ ), seguido por el tipo de subida de dosis media ( $p = 0,00005730$ ) y el tipo de subida de dosis alta ( $p = 0,00008040$ ) en este orden. Estos resultados revelan que se indicó de manera científica una dependencia de la dosis evidente para los efectos de mejora de la tasa de supervivencia en la prueba así como que el anticuerpo humanizado anti-Sema 3A tenía eficacia para controlar el estado inflamatorio mortal y para poder mejorar la tasa de supervivencia.

La figura 18 muestra la curva de supervivencia del grupo tratado con 500  $\mu\text{g}$  de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A, todos los casos del cual estaban vivos y mostraron efectos evidentes de mejora de la tasa de supervivencia. En la prueba de rangos logarítmicos, se obtuvieron resultados de que se cumplió un nivel de significación con  $p < 0,0001$ . Se encuentra evidentemente que el anticuerpo humanizado anti-Sema 3A controla el estado inflamatorio mortal incluso tras la aparición del estado y muestra efectos sobre la prolongación del periodo de supervivencia.

Ejemplo 18: efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre el ratón de modelo de coagulación intravascular diseminada

La coagulación intravascular diseminada (denominada a continuación en el presente documento DIC) asociada con septicemia, tumor sólido, etc., provoca un aumento del nivel en sangre de inhibidor del activador de plasminógeno 1 (denominado a continuación en el presente documento PAI-1) suprimiendo así la acción del sistema fibrinolítico, conduciendo al desarrollo de insuficiencia multiorgánica con estados graves. Se cree que la supresión del aumento del nivel en sangre de PAI-1 puede conducir a la inhibición de la progresión de DIC y, por tanto, se examinaron los efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre el nivel en sangre de PAI-1.

#### 1) Material de prueba

##### 1-1) LPS

Se preparó LPS (Sigma-Aldrich Japan, lote n.º: 102M4017V) con solución salina fisiológica a una concentración de 1,5 mg/ml.

##### 1-2) Anticuerpo humanizado anti-Sema 3A

Se preparó el anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) producido en el ejemplo 2 con solución salina fisiológica a una concentración de 5 mg/ml.

##### 1-3) Ratón

Se usaron ratones macho de 6 semanas de edad (C57BL/6J) adquiridos de CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.

#### 2) Método de prueba

##### 2-1) Agrupación

Tras adquirirse, se acondicionaron los ratones C57BL/6J en una sala de cría de ratones y se dividieron en 5 ratones por grupo y, entre ellos, se establecieron grupos de prueba tal como se muestra en la tabla 16.

## 2-2) Inoculación de LPS y administración de anticuerpo

Se inoculó LPS por vía intraperitoneal para inocularse en una cantidad de 15 mg/kg. Se administraron 0,1 ml de una disolución 5 mg/ml de la disolución de anticuerpo por la vena de la cola para inocularse la disolución en una cantidad de 500 µg/ratón. Obsérvese que al grupo de la condición 1 en el que no se inoculó LPS se le inoculó por vía intraperitoneal solución salina fisiológica.

## 2-3) Medición de PAI-1 de ratón

Se extrajo plasma a las 1,5, 3 y 9 horas tras la inoculación de LPS para medir los niveles en sangre de PAI-1 en el animal tratado usando un kit de ELISA de PAI-1 de ratón (Innovative Research, Inc).

[Tabla 16]

|              | LPS (mg/kg) | Tratado con anticuerpo (500 µg)       | Momento de extracción de sangre  |
|--------------|-------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Condición 1  | -           | -                                     | Momento de inicio de la prueba   |
| Condición 2  | 15          | -                                     | 1,5 h tras la inoculación de LPS |
| Condición 3  | 15          | 30 min antes de la inoculación de LPS | 1,5 h tras la inoculación de LPS |
| Condición 4  | 15          | 1 h tras la inoculación de LPS        | 1,5 h tras la inoculación de LPS |
| Condición 5  | 15          | -                                     | 3 h tras la inoculación de LPS   |
| Condición 6  | 15          | 30 min antes de la inoculación de LPS | 3 h tras la inoculación de LPS   |
| Condición 7  | 15          | 1 h tras la inoculación de LPS        | 3 h tras la inoculación de LPS   |
| Condición 8  | 15          | -                                     | 9 h tras la inoculación de LPS   |
| Condición 9  | 15          | 30 min antes de la inoculación de LPS | 9 h tras la inoculación de LPS   |
| Condición 10 | 15          | 1 h tras la inoculación de LPS        | 9 h tras la inoculación de LPS   |

## 3) Análisis estadístico

Para los grupos no tratado con anticuerpo y tratados con anticuerpo, se realizó una prueba de la t de Student de dos factores para calcular el valor de p y se evaluó el valor de p para indicar significación estadística en el caso del nivel de significación del 5% o inferior.

## 4) Resultados

La figura 19 muestra los resultados medidos de niveles en sangre de PAI-1. En el grupo no tratado con LPS (condición 1), el nivel en sangre de PAI-1 era muy bajo, pero el nivel en sangre de PAI-1 tras la inoculación de LPS indicó un aumento gradual tras 1,5 horas y aumentó significativamente 3 y 9 horas tras la inoculación de LPS en comparación con el animal no tratado con LPS (condiciones 2, 5 y 8).

En el grupo tratado con anticuerpo tras 3 horas desde la inoculación de LPS, tanto el grupo tratado con anticuerpo antes de la inoculación de LPS (condición 6,  $p = 0,0027$ ) como el grupo tratado con anticuerpo tras la inoculación de LPS (condición 7,  $p = 0,0051$ ) suprimieron el aumento de los niveles en sangre de PAI-1 en comparación con el grupo no tratado con anticuerpo. Este efecto de supresión del aumento de PAI-1 mediante el anticuerpo anti-Sema 3A humanizado persistió incluso 9 horas tras la inoculación de LPS y dio como resultado una supresión del aumento de los niveles en sangre de PAI-1 tanto en el grupo tratado con anticuerpo antes de la inoculación de LPS (condición 9,  $p < 0,0001$ ) como en el grupo tratado con anticuerpo tras la inoculación de LPS (condición 10,  $p = 0,0029$ ) de manera similar a la del grupo tratado con anticuerpo 3 horas tras la inoculación de LPS.

Estos resultados revelan que el anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) producido en el ejemplo 2 tiene la acción de suprimir el aumento del nivel en sangre de PAI-1, lo cual es uno de los factores agravantes de DIC.

Ejemplo 19: efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre la capacidad de migración de células cancerosas

Se sabe que las metástasis diseminadas y distales provocadas tras tratamiento quirúrgico o inducción de remisión mediante quimioterapia disminuyen en gran medida la tasa de supervivencia de un paciente con cáncer. La activación de la capacidad de migración de las células cancerosas permite liberar células cancerosas a partir del tumor primario, dando como resultado metástasis diseminadas y distales y, por tanto, se examinaron los efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre la alteración maligna de células cancerosas inducida por Sema 3A.

## 1) Método de prueba

Se usó el anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) producido en el ejemplo 2 para evaluar los efectos sobre la capacidad de migración de células cancerosas, que se induce mediante Sema 3A. En el presente

documento, se usaron células de cáncer de páncreas en el que los pacientes con un alto nivel de expresión de Sema 3A tienen un mal desenlace para examinar los efectos. Se llevó a cabo el procedimiento de experimentación particular de la siguiente manera.

Se diluyó fibronectina con tampón de PBS hasta 0,1 mg/ml para preparar un diluyente de fibronectina y se aplicaron 10 µl del diluyente de fibronectina sobre una superficie inferior de un filtro en una cámara de tipo de 24 pocillos (cámara Chemotaxicell fabricada por KURABO INDUSTRIES LTD., poro de 8 µm) y se dejó reposar el filtro y se secó a temperatura ambiente durante una hora, se preparó una cámara de migración dotada de la misma.

Posteriormente, se estableció la cámara de migración preparada en una placa de 24 pocillos, en la capa exterior de la cual se añadieron 600 µl de medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 0,1%. A la capa interior de la cámara se añadieron  $2 \times 10^5$  células/ml de línea celular de cáncer de páncreas humano (MIAPaCa-2) y 200 µl de medio DMEM libre de suero que contenía componentes de aditivo mostrados en la tabla 17, que se cultivó en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 4 horas. Posteriormente, se retiró la cámara y se extrajeron y se retiraron las células cancerosas en la capa interior de la cámara. Además, se retiraron las células residuales en la cámara usando un hisopo de algodón humedecido con tampón de PBS. Después, se sumergió la cámara con una disolución de tinción celular (Diff-Quick, SYSMEX INTERNATIONAL REAGENTS CO., LTD) durante 10 minutos o más, seguido por lavado dos veces con agua ultrapura y secado. Tras secarse, se midieron los recuentos de células que migraron a la superficie inferior del filtro de cámara mediante un microscopio.

[Tabla 17]

|             | Concentración final de componentes de aditivo en la capa interior de la cámara |                                                                                    |                                               |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|             | Sema 3A/Fc humana (µg/ml)                                                      | Anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) obtenido en el ejemplo 2 (µg/ml) | Anticuerpo humano de control negativo (µg/ml) |
| Condición 1 | -                                                                              | -                                                                                  | -                                             |
| Condición 2 | 100                                                                            | -                                                                                  | -                                             |
| Condición 3 | 100                                                                            | 0,1                                                                                | -                                             |
| Condición 4 | 100                                                                            | 1                                                                                  | -                                             |
| Condición 5 | 100                                                                            | 10                                                                                 | -                                             |
| Condición 6 | 100                                                                            | -                                                                                  | 0,1                                           |
| Condición 7 | 100                                                                            | -                                                                                  | 1                                             |
| Condición 8 | 100                                                                            | -                                                                                  | 10                                            |

## 2) Análisis estadístico

Teniendo en cuenta la multiplicidad, se aplicó una prueba de Dunnett de dos factores a las condiciones 3 a 5 y las condiciones 6 a 8 con respecto a la condición 2 para calcular los valores de p y cuando los valores de p tenían un nivel de significación del 5% o inferior, se evaluó que indicaban significación estadística.

## 3) Resultados de prueba

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20. La actividad de migración de células de cáncer de páncreas MIAPaCa-2 estimuladas mediante Sema 3A humana se potenció dos veces o más (condición 2). Sin embargo, la actividad de migración de células de cáncer de páncreas inducida por Sema 3A se suprimió en presencia de anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (condiciones 3 a 5). En el grupo tratado con 1 µg/ml de anticuerpo anti-Sema 3A ( $P = 0,0031$ ) y el grupo tratado con 10 µg/ml ( $P < 0,001$ ), la migración de células cancerosas se suprimió hasta el mismo nivel que el grupo no tratado con Sema 3A (condición 1). Por otro lado, en el grupo de control negativo, la migración de células cancerosas inducida por Sema 3A no se suprimió (condiciones 6 a 8). Es decir, los resultados revelan que el anticuerpo anti-Sema 3A que contiene CDR que tiene una secuencia de aminoácidos específica suprime específicamente la migración de células de cáncer de páncreas inducida por Sema 3A.

Ejemplo 20: efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre la capacidad de invasión de células cancerosas

Las células cancerosas que tienen la capacidad de migración activada producen la lisis e invaden los sustratos extracelulares circundantes y después destruyen la membrana basal para transferirse a vasos sanguíneos y linfáticos, transfiriéndose eventualmente a órganos distantes. La supresión de la invasión y metástasis de células cancerosas conduce a la supresión de recidiva metastásica y por tanto se considera que es útil para la mejora de la tasa de supervivencia de pacientes con cáncer. Además de suprimir los efectos sobre la potenciación de la capacidad de migración inducida por Sema 3A examinados en el ejemplo 19, se examinaron los efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre la capacidad de invasión de células cancerosas.

## 1) Método de prueba

Se cargaron sustratos extracelulares de los que se retiraron los factores de crecimiento (Becton, Dickinson and Company, Matrigel (marca registrada) con reducción de factores de crecimiento) en la capa interior de la cámara de invasión (Becton, Dickinson and Company, BioCoat (marca registrada), poro de 8  $\mu\text{m}$ , n.º 354483), que se usó para evaluar los efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre la capacidad de invasión de células cancerosas inducida por Sema 3A. Se llevó a cabo el procedimiento de experimentación particular de la siguiente manera.

Para las células cancerosas, se usaron línea celular de cáncer de páncreas humano (MIAPaCa-2), línea de glioblastoma humano (U87MG) y línea celular de cáncer de pulmón derivada de ratón (3LL). En primer lugar, se trataron los sustratos extracelulares cargados en una cámara de invasión mediante hinchamiento y, después, se estableció la cámara de invasión en una placa de 24 pocillos, a la capa exterior de la cual se añadieron 0,75 ml de medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 0,1% (suero bovino fetal al 1% para células 3LL) y a la capa interior de la cual se añadieron  $2 \times 10^5$  células/ml de células cancerosas y 125  $\mu\text{l}$  de medio DMEM libre de suero que contenía componentes de aditivo a las concentraciones mostradas en la tabla 18 y se cultivó la cámara en presencia de  $\text{CO}_2$  al 5% a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se retiró la cámara de invasión, seguido por retirada de células residuales en la capa interior de la cámara de invasión de la misma manera que en el ejemplo 19 y, después, se midieron los recuentos de células invadidas, que se transfirieron a la superficie inferior del filtro, mediante un microscopio.

[Tabla 18]

|              | Componentes añadidos a la capa interior de la cámara de invasión |                                                                                                 |                                                            |
|--------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
|              | Sema 3A humana (g/ml)                                            | Anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) obtenido en el ejemplo 2 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Anticuerpo humano de control negativo ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
| Condición 1  | -                                                                | -                                                                                               | -                                                          |
| Condición 2  | -                                                                | 0,1                                                                                             | -                                                          |
| Condición 3  | -                                                                | 1,0                                                                                             | -                                                          |
| Condición 4  | -                                                                | 10,0                                                                                            | -                                                          |
| Condición 5  | 100                                                              | -                                                                                               | -                                                          |
| Condición 6  | 100                                                              | 0,1                                                                                             | -                                                          |
| Condición 7  | 100                                                              | 1,0                                                                                             | -                                                          |
| Condición 8  | 100                                                              | 10,0                                                                                            | -                                                          |
| Condición 9  | 100                                                              | -                                                                                               | 0,1                                                        |
| Condición 10 | 100                                                              | -                                                                                               | 1,0                                                        |
| Condición 11 | 100                                                              | -                                                                                               | 10,0                                                       |

## 2) Análisis estadístico

Para la acción inhibitoria de la actividad de invasión inducida por Sema 3A, teniendo en cuenta la multiplicidad, se aplicó una prueba de Dunnett de dos factores a las condiciones 6 a 8 y las condiciones 9 a 10 con respecto a la condición 5 para calcular los valores de p y cuando los valores de p tenían un nivel de significación del 5% o inferior, se evaluó que indicaban la significación estadística. En la tabla 19 se muestra una lista de valores de p.

## 3) Resultados de prueba

Los resultados medidos de recuentos de células invadidas se muestran en la figura 21 para células MIAPaCa-2, en la figura 22 para células U87MG y en la figura 23 para células 3LL en las condiciones anteriormente mencionadas. En el caso de la adición de Sema 3A (condición 5), todas las líneas de células cancerosas mostraron capacidad de invasión evidentemente potenciada en comparación con el grupo no estimulado con Sema 3A (condición 1). En el caso de la adición de Sema 3A humana junto con anticuerpo humanizado anti-Sema 3A, todas las líneas de células cancerosas mostraron una invasión suprimida hasta el mismo grado que el grupo no estimulado con Sema 3A (condiciones 6 a 8). En la condición no estimulada con Sema 3A, no se observaron efectos de supresión de la invasión sorprendentes excepto en 3LL (condiciones 1 a 4). Por otro lado, en el grupo de control negativo que contiene anticuerpo, la potenciación de la capacidad de invasión de células cancerosas inducida por Sema 3A se suprimió poco (condiciones 9 a 11). La figura 24 muestra imágenes de microscopio de células 3LL invadidas. Se observa visualmente que en la condición 5 en la que se añadió Sema 3A, invadieron significativamente las células cancerosas en comparación con la condición 1 en la que no se añadió Sema 3A, y en las condiciones 7 y 8 en las que se trató con anticuerpo humanizado anti-Sema 3A en presencia de Sema 3A, se suprimió aparentemente la actividad de invasión de células cancerosas inducida por Sema 3A. Tal como se muestra aparentemente en estos resultados, se revela que el anticuerpo anti-Sema 3A que contiene una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos específica tiene la acción de suprimir la actividad de invasión de células cancerosas inducida por Sema 3A hasta el mismo grado que el grupo no estimulado con Sema 3A.

[Tabla 19]

|  | Resultados de la prueba de Dunnett |
|--|------------------------------------|
|--|------------------------------------|

|              | MIAPaCa-2  | U87MG      | 3LL        |
|--------------|------------|------------|------------|
| Condición 6  | p = 0,4339 | p < 0,001  | p = 0,3278 |
| Condición 7  | p = 0,0012 | p < 0,001  | p = 0,0091 |
| Condición 8  | p < 0,001  | p < 0,001  | p = 0,0022 |
| Condición 9  | p = 0,952  | p = 0,8182 | p = 0,302  |
| Condición 10 | p = 0,920  | p = 0,8676 | p = 0,142  |
| Condición 11 | p = 0,987  | p = 0,0046 | p = 0,903  |

Ejemplo 21: efectos del anticuerpo humanizado anti-Sema 3A sobre la falta de respuesta a agente anticanceroso inducida por Sema 3A

Se sabe que el cáncer de páncreas tiene una tasa de supervivencia a los 5 años muy baja entre el cáncer. La etiología incluye: en tejido de cáncer de páncreas que está en un estado hipovascular, las células cancerosas pueden proliferar y desarrollarse incluso en un estado de privación de nutrientes de este tipo y con frecuencia tienen tolerancia frente a un agente anticanceroso tal como clorhidrato de gemcitabina (denominada a continuación en el presente documento GEM). Es decir, el tratamiento de cáncer de páncreas, superar la falta de respuesta frente a un agente anticanceroso es un objeto importante y, por tanto, se evaluaron la tolerancia farmacológica inducida por Sema 3A y la acción de eliminación de la tolerancia mediante anticuerpo anti-Sema 3A humanizado en el estado de privación de nutrientes.

#### 1) Método de prueba

En un estado de privación de nutrientes característico de cáncer de páncreas, se evaluaron los efectos de anticuerpo anti-Sema 3A humanizado (el humanizado 2 producido en el ejemplo 2) sobre la falta de respuesta frente a GEM inducida por Sema 3A. Se llevó a cabo el procedimiento de experimentación particular de la siguiente manera.

Se sembró una suspensión celular en la que se suspendieron  $4 \times 10^4$  células/ml de células de páncreas humanas (MIAPaCa-2) en medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en una cantidad de 100  $\mu$ l para cada uno. Se cultivó la placa en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 24 horas y después se sustituyó el medio por 100  $\mu$ l de medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 0,1%, seguido por cultivo durante otras 24 horas. Posteriormente, a cada pocillo se le añadieron 100  $\mu$ l de medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 0,1% con cantidades dadas de componentes mostrados en la tabla 20, seguido por cultivo durante 2 días. Después, se retiró el sobrenadante de cultivo a partir de cada pocillo en una cantidad de 100  $\mu$ l y a cada pocillo se le añadió reactivo CellTiter (ensayo de proliferación en disolución CellTiter AQueous One; Promega) de 20  $\mu$ l, seguido por cultivo en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante una hora y después se midió la absorbancia a 490 nm.

[Tabla 20]

|             | Concentración final de componentes en cada pocillo |                                 |                                                                                          |                                                     |
|-------------|----------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|             | Sema 3A/Fc humana (ng/ml)                          | Clorhidrato de gemcitabina (nM) | Anticuerpo humanizado anti-Sema 3A (humanizado 2) obtenido en el ejemplo 2 ( $\mu$ g/ml) | Anticuerpo humano de control negativo ( $\mu$ g/ml) |
| Condición 1 | -                                                  | -                               | -                                                                                        | -                                                   |
| Condición 2 | -                                                  | 10                              | -                                                                                        | -                                                   |
| Condición 3 | 100                                                | 10                              | -                                                                                        | -                                                   |
| Condición 4 | 100                                                | 10                              | 0,1                                                                                      | -                                                   |
| Condición 5 | 100                                                | 10                              | 1                                                                                        | -                                                   |
| Condición 6 | 100                                                | 10                              | 10                                                                                       | -                                                   |
| Condición 7 | 100                                                | 10                              | -                                                                                        | 0,1                                                 |
| Condición 8 | 100                                                | 10                              | -                                                                                        | 1                                                   |
| Condición 9 | 100                                                | 10                              | -                                                                                        | 10                                                  |

#### 2) Análisis estadístico

Teniendo en cuenta la multiplicidad, se aplicó una prueba de Dunnett de dos factores a las condiciones 4 a 6 y las condiciones 7 a 9 con respecto a la condición 3 para calcular los valores de p y cuando los valores de p tenían un nivel de significación del 5% o inferior, se evaluó que indicaban significación estadística. Los valores de p se muestran en la tabla 21.

#### 3) Resultados de prueba

La figura 25 muestra resultados de evaluación de la proliferación de células de páncreas. GEM suprimió la

proliferación de células de páncreas (condición 2 con respecto a la condición 1), sin embargo, Sema 3A humana redujo la sensibilidad frente a GEM e indujo falta de respuesta a fármaco (condición 3 con respecto a la condición 2). La tolerancia frente a GEM inducida por Sema 3A se eliminó con anticuerpo humanizado anti-Sema 3A de 1 ó 10 µg/ml y la sensibilidad frente a GEM se recuperó hasta el mismo grado que una condición en ausencia de Sema 3A (condiciones 4 a 6 con respecto a la condición 3). Por otro lado, el grupo de control negativo que contiene anticuerpo humano no pudo recuperar la sensibilidad frente a GEM hasta el mismo grado que una condición en ausencia de Sema 3A (condiciones 7 a 9). Los resultados revelan que el anticuerpo anti-Sema 3A humanizado producido en el ejemplo 2 tiene la capacidad de eliminar la tolerancia frente a agente anticanceroso agente inducida por Sema 3A en una privación de nutrientes de este tipo como tejido de cáncer de páncreas.

[Tabla 21]

| Concentración de anticuerpo (µg/ml) | Resultados de la prueba de Dunnett |                                       |
|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
|                                     | Anticuerpo humanizado anti-Sema 3A | Anticuerpo humano de control negativo |
| 0,1                                 | p = 0,0150                         | p = 0,0414                            |
| 1                                   | p < 0,001                          | p = 0,0179                            |
| 10                                  | p < 0,001                          | p = 0,0147                            |

#### Texto libre de lista de secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 1) (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 2) (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

SEQ ID NO: 15 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).

- SEQ ID NO: 16 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 5 SEQ ID NO: 17 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 18 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 10 SEQ ID NO: 19 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 20 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 15 SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 22 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 20 SEQ ID NO: 23 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 24 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 25 SEQ ID NO: 25 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 1) (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 30 SEQ ID NO: 26 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 2) (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 27 es la secuencia de nucleótidos de cebador 1.
- 35 SEQ ID NO: 28 es la secuencia de nucleótidos de cebador 2.
- SEQ ID NO: 29 es la secuencia de nucleótidos de cebador 3.
- 40 SEQ ID NO: 30 es la secuencia de nucleótidos de cebador 4.
- SEQ ID NO: 31 es la secuencia de nucleótidos de cebador 5.
- SEQ ID NO: 32 es la secuencia de nucleótidos de cebador 6.
- 45 SEQ ID NO: 33 es la secuencia de nucleótidos de cebador 7.
- SEQ ID NO: 34 es la secuencia de nucleótidos de cebador 8.
- 50 SEQ ID NO: 35 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 36 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 55 SEQ ID NO: 37 es la secuencia de nucleótidos de cebador A<sub>γ</sub>.
- SEQ ID NO: 38 es la secuencia de nucleótidos de cebador B<sub>γ</sub>.
- 60 SEQ ID NO: 39 es la secuencia de nucleótidos de cebador C<sub>γ</sub>.
- SEQ ID NO: 40 es la secuencia de nucleótidos de cebador D<sub>γ</sub>.
- SEQ ID NO: 41 es la secuencia de nucleótidos de cebador E<sub>γ</sub>.
- 65

- SEQ ID NO: 42 es la secuencia de nucleótidos de cebador F<sub>γ</sub>.
- SEQ ID NO: 43 es la secuencia de nucleótidos de cebador G<sub>γ</sub>.
- 5 SEQ ID NO: 44 es la secuencia de nucleótidos de cebador H<sub>γ</sub>.
- SEQ ID NO: 45 es la secuencia de nucleótidos de cebador I<sub>γ</sub>.
- 10 SEQ ID NO: 46 es la secuencia de nucleótidos de cebador J<sub>γ</sub>.
- SEQ ID NO: 47 es la secuencia de nucleótidos de cebador K<sub>γ</sub>.
- SEQ ID NO: 48 es la secuencia de nucleótidos de cebador L<sub>γ</sub>.
- 15 SEQ ID NO: 49 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpos humanizados (humanizado 1 y humanizado 2) (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 50 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpos humanizados (humanizado 1 y humanizado 2) (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 20 SEQ ID NO: 51 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 1) (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 52 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 1) (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 25 SEQ ID NO: 53 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 2) (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 54 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 2) (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 30 SEQ ID NO: 55 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 35 SEQ ID NO: 56 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 57 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- 40 SEQ ID NO: 58 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-humano (derivado de cepa de clon n.º 4-2).
- SEQ ID NO: 59 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 45 SEQ ID NO: 60 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 50 SEQ ID NO: 61 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- SEQ ID NO: 62 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 55 SEQ ID NO: 63 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 60 SEQ ID NO: 64 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- SEQ ID NO: 65 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 65

- SEQ ID NO: 66 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 5 SEQ ID NO: 67 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- SEQ ID NO: 68 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 10 SEQ ID NO: 69 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- SEQ ID NO: 70 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 15 SEQ ID NO: 71 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- SEQ ID NO: 72 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- 20 SEQ ID NO: 73 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- SEQ ID NO: 74 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- 25 SEQ ID NO: 75 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).
- 30 SEQ ID NO: 76 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).
- SEQ ID NO: 77 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).
- 35 SEQ ID NO: 78 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).
- SEQ ID NO: 79 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).
- 40 SEQ ID NO: 80 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).
- 45 SEQ ID NO: 81 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).
- SEQ ID NO: 82 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).
- 50 SEQ ID NO: 83 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).
- SEQ ID NO: 84 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).
- 55 SEQ ID NO: 85 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).
- 60 SEQ ID NO: 86 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).
- SEQ ID NO: 87 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).
- 65

- SEQ ID NO: 88 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).
- 5 SEQ ID NO: 89 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).
- SEQ ID NO: 90 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).
- 10 SEQ ID NO: 91 es la secuencia de nucleótidos de cebador M<sub>γ</sub>.
- SEQ ID NO: 92 es la secuencia de nucleótidos de cebador N<sub>γ</sub>.
- 15 SEQ ID NO: 93 es la secuencia de nucleótidos de cebador O<sub>γ</sub>.
- SEQ ID NO: 94 es la secuencia de nucleótidos de cebador P<sub>γ</sub>.
- 20 SEQ ID NO: 95 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de región constante de cadena pesada de anticuerpo humanizado.
- SEQ ID NO: 96 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de región constante de cadena ligera de anticuerpo humanizado.
- 25 SEQ ID NO: 97 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 60) de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- SEQ ID NO: 98 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 61) de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 30 SEQ ID NO: 99 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 62) de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- SEQ ID NO: 100 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 64) de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 35 SEQ ID NO: 101 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 65) de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- SEQ ID NO: 102 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 66) de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 40 SEQ ID NO: 103 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 59) de región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- 45 SEQ ID NO: 104 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 63) de región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 165).
- SEQ ID NO: 105 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 68) de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- 50 SEQ ID NO: 106 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 69) de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- SEQ ID NO: 107 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 70) de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- 55 SEQ ID NO: 108 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 72) de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- 60 SEQ ID NO: 109 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 73) de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- SEQ ID NO: 110 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 74) de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).
- 65 SEQ ID NO: 111 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 67) de

región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).

SEQ ID NO: 112 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 71) de región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ave-ratón (derivado de cepa de clon n.º 582).

SEQ ID NO: 113 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 76) de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).

SEQ ID NO: 114 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 77) de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).

SEQ ID NO: 115 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 78) de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).

SEQ ID NO: 116 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 80) de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).

SEQ ID NO: 117 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 81) de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).

SEQ ID NO: 118 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 82) de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).

SEQ ID NO: 119 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 75) de región variable de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).

SEQ ID NO: 120 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 79) de región variable de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 240-40).

SEQ ID NO: 121 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 84) de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).

SEQ ID NO: 122 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 85) de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).

SEQ ID NO: 123 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 86) de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).

SEQ ID NO: 124 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 88) de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).

SEQ ID NO: 125 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 89) de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).

SEQ ID NO: 126 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 90) de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).

SEQ ID NO: 127 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 83) de región variable de cadena pesada de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).

SEQ ID NO: 128 es la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 87) de región variable de cadena ligera de anticuerpo de ave (derivado de cepa de clon n.º 255-72).

**Lista de secuencias**

<110> Chiome Bioscience Inc. YOKOHAMA CITY UNIVERSITY

5 <120> A

<130> 13030WO

<150> Documento JP2023-21309

10 <151> 06-02-2013

<160> 128

15 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 5

20 <212> PRT

<213> *Gallus gallus*

25 <400> 1

Ser Tyr Pro Met Gly  
1 5

<210> 2

30 <211> 18

<212> PRT

35 <213> *Gallus gallus*

<400> 2

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

Lys Gly

40 <210> 3

<211> 14

45 <212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 3

50 His Thr Gly Ile Gly Ala Asn Ser Ala Gly Ser Ile Asp Ala  
1 5 10

<210> 4

55 <211> 13

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 4

Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly  
 1 5 10

5 <210> 5

<211> 7

10 <212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 5

15 Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 6

20 <211> 9

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

25 <400> 6

Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Asp Ala  
 1 5

30 <210> 7

<211> 124

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

40 <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-humano

<400> 7

# ES 2 728 854 T3

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

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

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

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

Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val  
65 70 75 80

Arg Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Lys His Thr Gly Ile Gly Ala Asn Ser Ala Gly Ser Ile Asp  
100 105 110

Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
115 120

<210> 8

5 <211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-humano

15 <400> 8

# ES 2 728 854 T3

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

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

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

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

Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val  
65 70 75 80

Arg Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Lys His Thr Gly Ile Gly Ala Asn Ser Ala Gly Ser Ile Asp  
100 105 110

Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
115 120

<210> 9

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-humano

15 <400> 9

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

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Gly Ser Tyr Tyr Tyr  
20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Pro Gly Ser Ala Leu Val Thr Met Ile

# ES 2 728 854 T3

35

40

45

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

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala  
65 70 75 80

Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Asp  
85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 10

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-humano

15 <400> 10

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

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Gly Ser Tyr Tyr Tyr  
20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Pro Gly Ser Ala Leu Val Thr Met Ile  
35 40 45

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

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala  
65 70 75 80

Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Asp  
85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 11

20

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado

<400> 11

10

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

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

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

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

Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val  
65 70 75 80

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

Cys Ala Lys His Thr Gly Ile Gly Ala Asn Ser Ala Gly Ser Ile Asp  
100 105 110

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 12

15 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 1)

25 <400> 12

# ES 2 728 854 T3

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Gly Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Met  
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Glu Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Leu Ser Gly Thr Thr Asn Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln  
65 70 75 80

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly  
85 90 95

Asp Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

<210> 13

5

<211> 108

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 2)

15

<400> 13

# ES 2 728 854 T3

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Gly Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val  
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Glu Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Leu Ser Gly Thr Thr Asn Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln  
65 70 75 80

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly  
85 90 95

Asp Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

<210> 14

5 <211> 372

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-humano

15

<400> 14

gccgtgacgt tggacgagtc cgggggcggc ctccagacgc ccgggggagc gctcagcctc 60

gtctgcaagg cctccgggtt caccttcagc agttatccca tgggttgggt gcgacaggcg 120

cccggcaagg ggctggagtg ggtcgtctgt attgatgatg atggtgatag tgacacaaga 180

tacgcgccgg cgggtgaagg ccgtgccacc atctcgaggg acaacgggca gagcacagtg 240

aggctgcagc tgaacaacct cagggctgag gacaccggca cctactactg cgccaaacat 300

actgggtattg gtgctaata tagctggtagc atcgacgcat ggggccacgg gaccgaagtc 360

atcgtctcct cc 372

20

<210> 15

<211> 372

25

<212> ADN

<213> Artificial

|    |                                                                                                                                                    |     |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | <220>                                                                                                                                              |     |
|    | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-humano |     |
| 5  | <400> 15                                                                                                                                           |     |
|    | gccgtgacgt tggacgagtc cgggggcggc ctccagacgc ccgggggagc gctcagcctc                                                                                  | 60  |
|    | gtctgcaagg cctccgggtt caccttcagc agttatccca tgggttgggt gcgacaggcg                                                                                  | 120 |
|    | cccggcaagg ggctggagtg ggtcgctggt attgatgatg atggtgatag tgacacaaga                                                                                  | 180 |
|    | tacgcgccgg cgggtgaagg ccgtgccacc atctcgaggg acaacgggca gagcacagtg                                                                                  | 240 |
|    | aggctgcagc tgaacaacct cagggctgag gacaccggca cctactactg cgccaaacat                                                                                  | 300 |
|    | actggtattg gtgctaatag tgctggtagc atcgacgcac ggggccacgg gaccgaagtc                                                                                  | 360 |
|    | atcgtctcct cc                                                                                                                                      | 372 |
| 10 | <210> 16                                                                                                                                           |     |
|    | <211> 321                                                                                                                                          |     |
|    | <212> ADN                                                                                                                                          |     |
| 15 | <213> Artificial                                                                                                                                   |     |
|    | <220>                                                                                                                                              |     |
| 20 | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-humano |     |
|    | <400> 16                                                                                                                                           |     |
|    | gcgctgactc agccggcctc ggtgtcagca aacctgggag gaaccgtcaa gatcacctgc                                                                                  | 60  |
|    | tccgggggtg gcagctatac tggaagttac tattatggct ggtaccagca gaagtctcct                                                                                  | 120 |
|    | ggcagtgccc ttgtcactat gatctattac aacaacaaga gaccctcgga catcccttca                                                                                  | 180 |
|    | cgattctccg gttccctatc cggctccaca aacacattaa ccatcactgg ggtccgagcc                                                                                  | 240 |
|    | gatgacgagg ctgtctatct ctgtgggagt gcagacaaca gtggtgatgc atttggggcc                                                                                  | 300 |
| 25 | gggacaaccc tgaccgtcct a                                                                                                                            | 321 |
|    | <210> 17                                                                                                                                           |     |
|    | <211> 321                                                                                                                                          |     |
| 30 | <212> ADN                                                                                                                                          |     |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                   |     |
| 35 | <220>                                                                                                                                              |     |
|    | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-humano |     |
| 40 | <400> 17                                                                                                                                           |     |

# ES 2 728 854 T3

|    |                                                                    |     |
|----|--------------------------------------------------------------------|-----|
|    | gcgctgactc agccggcctc ggtgtcagca aacctgggag gaaccgtcaa gatcacctgc  | 60  |
|    | tccgggggtg gcagctatac tggaagttac tattatggct ggtaccagca gaagtctcct  | 120 |
|    | ggcagtgtccc ttgtcactat gatctattac aacaacaaga gaccctcgga catcccttca | 180 |
|    | cgattctccg gtccctatc cggctccaca aacacattaa ccatcactgg ggtccgagcc   | 240 |
|    | gatgacgagg ctgtctatct ctgtgggagt gcagacaaca gtggtgatgc atttggggcc  | 300 |
|    | gggacaaccc tgaccgtcct a                                            | 321 |
|    | <210> 18                                                           |     |
| 5  | <211> 15                                                           |     |
|    | <212> ADN                                                          |     |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                         |     |
| 10 | <400> 18                                                           |     |
|    | agttatccca tgggt                                                   | 15  |
| 15 | <210> 19                                                           |     |
|    | <211> 54                                                           |     |
|    | <212> ADN                                                          |     |
| 20 | <213> <i>Gallus gallus</i>                                         |     |
|    | <400> 19                                                           |     |
| 25 | ggtattgatg atgatggga tagtgacaca agatacgcgc cggcggtgaa gggc         | 54  |
|    | <210> 20                                                           |     |
|    | <211> 42                                                           |     |
| 30 | <212> ADN                                                          |     |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                         |     |
| 35 | <400> 20                                                           |     |
|    | catactgga ttggtgctaa tagtgctggt agcatcgacg ca                      | 42  |
|    | <210> 21                                                           |     |
| 40 | <211> 39                                                           |     |
|    | <212> ADN                                                          |     |
| 45 | <213> <i>Gallus gallus</i>                                         |     |
|    | <400> 21                                                           |     |
| 50 | tccgggggtg gcagctatac tggaagttac tattatggc                         | 39  |
|    | <210> 22                                                           |     |
|    | <211> 21                                                           |     |
| 55 | <212> ADN                                                          |     |

|    |                                                                                                                                                    |     |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                                                                                                         |     |
|    | <400> 22                                                                                                                                           |     |
| 5  | tacaacaaca agagaccctc g                                                                                                                            | 21  |
|    | <210> 23                                                                                                                                           |     |
| 10 | <211> 27                                                                                                                                           |     |
|    | <212> ADN                                                                                                                                          |     |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                                                                                                         |     |
| 15 | <400> 23                                                                                                                                           |     |
|    | gggagtgcag acaacagtgg tgatgca                                                                                                                      | 27  |
| 20 | <210> 24                                                                                                                                           |     |
|    | <211> 372                                                                                                                                          |     |
|    | <212> ADN                                                                                                                                          |     |
| 25 | <213> Artificial                                                                                                                                   |     |
|    | <220>                                                                                                                                              |     |
| 30 | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado                |     |
|    | <400> 24                                                                                                                                           |     |
|    | gaagtgcagc tgctggagag cgggggggga ctggtgcagc ccggcgggag tctgagactg                                                                                  | 60  |
|    | tcatgcgccg ctagcggggt cacttttagc tcctacccaa tgggatgggt caggcaggca                                                                                  | 120 |
|    | cctggcaagg gactggagtg ggtggctggc atcgacgatg acggggattc tgacaccgga                                                                                  | 180 |
|    | tacgtcctcg cagtgaaggg acgagccacc atttcagag ataactctaa aaatacagtc                                                                                   | 240 |
|    | tatctgcaga tgaacagcct gcgagctgaa gacactgcag tgtactattg cgccaagcac                                                                                  | 300 |
|    | accggaatcg gcgccaattc tgctggcagt attgatgctt gggggcaggg aaccctggtc                                                                                  | 360 |
| 35 | acagtgtcta gt                                                                                                                                      | 372 |
|    | <210> 25                                                                                                                                           |     |
|    | <211> 324                                                                                                                                          |     |
| 40 | <212> ADN                                                                                                                                          |     |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                   |     |
| 45 | <220>                                                                                                                                              |     |
|    | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 1) |     |
| 50 | <400> 25                                                                                                                                           |     |

# ES 2 728 854 T3

|    |                                                                                                                                                            |     |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | tcatacgaac tgacccagcc ccctagcgtc tccgtgtctc ccgggcagac tgcaaggatc                                                                                          | 60  |
|    | acctgcagcg gaggaggatc ctataccggg tcttactatt acggatggta ccagcagaag                                                                                          | 120 |
|    | ccaggacagg ctcccgtgac aatgatctat tacaacaaca agcggccttc tgacattcca                                                                                          | 180 |
|    | gagcggttca gcggatcact gagcggcacc acaaactc tgaccattag cggggtgcag                                                                                            | 240 |
|    | gccgaggacg aagctgatta ttactgcggc agtgcagaca atagcgggga tgccttcggc                                                                                          | 300 |
|    | acagggacta aagtgactgt cctg                                                                                                                                 | 324 |
|    | <210> 26                                                                                                                                                   |     |
| 5  | <211> 324                                                                                                                                                  |     |
|    | <212> ADN                                                                                                                                                  |     |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                           |     |
| 10 | <220>                                                                                                                                                      |     |
|    | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado \201iHumanized -2\201j |     |
| 15 | <400> 26                                                                                                                                                   |     |
|    | tcatacgaac tgacccagcc ccctagcgtc tccgtgtctc ccgggcagac tgcaaggatc                                                                                          | 60  |
|    | acctgcagcg gaggaggatc ctataccggg tcttactatt acggatggta ccagcagaag                                                                                          | 120 |
|    | ccaggacagg ctcccgtgac agtgatctat tacaacaaca agcggccttc tgacattcca                                                                                          | 180 |
|    | gagcggttca gcggatcact gagcggcacc acaaactc tgaccattag cggggtgcag                                                                                            | 240 |
|    | gccgaggacg aagctgatta ttactgcggc agtgcagaca atagcgggga tgccttcggc                                                                                          | 300 |
|    | acagggacta aagtgactgt cctg                                                                                                                                 | 324 |
| 20 | <210> 27                                                                                                                                                   |     |
|    | <211> 40                                                                                                                                                   |     |
|    | <212> ADN                                                                                                                                                  |     |
| 25 | <213> Artificial                                                                                                                                           |     |
|    | <220>                                                                                                                                                      |     |
| 30 | <223> Cebador 1                                                                                                                                            |     |
|    | <400> 27                                                                                                                                                   |     |
| 35 | gaagatctaa gcttgcatg gcctgggctc ctctctct                                                                                                                   | 40  |
|    | <210> 28                                                                                                                                                   |     |
|    | <211> 27                                                                                                                                                   |     |
| 40 | <212> ADN                                                                                                                                                  |     |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                           |     |
|    | <220>                                                                                                                                                      |     |

|    |                                          |    |
|----|------------------------------------------|----|
|    | <223> Cebador 2                          |    |
|    | <400> 28                                 |    |
| 5  | tggcgaagac ttcggctggc ctaggac            | 27 |
|    | <210> 29                                 |    |
| 10 | <211> 30                                 |    |
|    | <212> ADN                                |    |
|    | <213> Artificial                         |    |
| 15 | <220>                                    |    |
|    | <223> Cebador 3                          |    |
| 20 | <400> 29                                 |    |
|    | gaagatctaa gcttaccatg agcccactcg         | 30 |
|    | <210> 30                                 |    |
| 25 | <211> 39                                 |    |
|    | <212> ADN                                |    |
| 30 | <213> Artificial                         |    |
|    | <220>                                    |    |
|    | <223> Cebador 4                          |    |
| 35 | <400> 30                                 |    |
|    | cgatggggct gttgttttg cgaggagac gatgacttc | 39 |
| 40 | <210> 31                                 |    |
|    | <211> 30                                 |    |
|    | <212> ADN                                |    |
| 45 | <213> Artificial                         |    |
|    | <220>                                    |    |
| 50 | <223> Cebador 5                          |    |
|    | <400> 31                                 |    |
|    | aagtcttcgc catcagtcac cctgtttcca         | 30 |
| 55 | <210> 32                                 |    |
|    | <211> 27                                 |    |
| 60 | <212> ADN                                |    |
|    | <213> Artificial                         |    |
|    | <220>                                    |    |
| 65 | <223> Cebador 6                          |    |

<400> 32  
 5 tatgcggccg cttactagga acagtca 27  
 <210> 33  
 <211> 39  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador 7  
 <400> 33  
 20 gccaaaacaa cagccccatc ggtctatcca ctggcccct 39  
 <210> 34  
 <211> 28  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador 8  
 <400> 34  
 35 agatagcggc cgcttatcat ttaccggg 28  
 <210> 35  
 40 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón  
 50 <400> 35  
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

# ES 2 728 854 T3

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

# ES 2 728 854 T3

260

265

270

Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn  
275 280 285

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn  
290 295 300

Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp  
305 310 315 320

Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro  
325 330 335

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

Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys  
355 360 365

Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile  
370 375 380

Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn  
385 390 395 400

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

Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys  
420 425 430

Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe  
435 440 445

Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
450

<210> 36

5 <211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón

15 <400> 36

# ES 2 728 854 T3

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

5 <210> 37

<211> 26

<212> ADN

10

<213> Artificial

|    |                             |    |
|----|-----------------------------|----|
|    | <220>                       |    |
|    | <223> Cebador A gamma       |    |
| 5  | <400> 37                    |    |
|    | gaagatctaa gcttcacca tggcat | 26 |
| 10 | <210> 38                    |    |
|    | <211> 24                    |    |
|    | <212> ADN                   |    |
| 15 | <213> Artificial            |    |
|    | <220>                       |    |
| 20 | <223> Cebador B gamma       |    |
|    | <400> 38                    |    |
|    | ttgtaataga tcactgtcac ggga  | 24 |
| 25 | <210> 39                    |    |
|    | <211> 24                    |    |
|    | <212> ADN                   |    |
| 30 | <213> Artificial            |    |
|    | <220>                       |    |
| 35 | <223> Cebador C gamma       |    |
|    | <400> 39                    |    |
| 40 | tcccgtagaca gtgatctatt acaa | 24 |
|    | <210> 40                    |    |
|    | <211> 25                    |    |
| 45 | <212> ADN                   |    |
|    | <213> Artificial            |    |
|    | <220>                       |    |
| 50 | <223> Cebador D gamma       |    |
|    | <400> 40                    |    |
| 55 | agatagcggc cgcttaggaa cattc | 25 |
|    | <210> 41                    |    |
| 60 | <211> 36                    |    |
|    | <212> ADN                   |    |
|    | <213> Artificial            |    |
| 65 | <220>                       |    |

|    |                                        |    |
|----|----------------------------------------|----|
|    | <223> Cebador E gamma                  |    |
|    | <400> 41                               |    |
| 5  | gaagatctaa gcttcacca tggcctgggc tcctct | 36 |
|    | <210> 42                               |    |
|    | <211> 31                               |    |
| 10 | <212> ADN                              |    |
|    | <213> Artificial                       |    |
| 15 | <220>                                  |    |
|    | <223> Cebador F gamma                  |    |
|    | <400> 42                               |    |
| 20 | ctttgggctg gcctaggacg gtcagggttg t     | 31 |
|    | <210> 43                               |    |
| 25 | <211> 32                               |    |
|    | <212> ADN                              |    |
|    | <213> Artificial                       |    |
| 30 | <220>                                  |    |
|    | <223> Cebador G gamma                  |    |
| 35 | <400> 43                               |    |
|    | gaagatctaa gcttcacca tgagcccact cg     | 32 |
|    | <210> 44                               |    |
| 40 | <211> 34                               |    |
|    | <212> ADN                              |    |
| 45 | <213> Artificial                       |    |
|    | <220>                                  |    |
|    | <223> Cebador H gamma                  |    |
| 50 | <400> 44                               |    |
|    | gcccctttgt actagcggag gagacgatga cttc  | 34 |
| 55 | <210> 45                               |    |
|    | <211> 27                               |    |
|    | <212> ADN                              |    |
| 60 | <213> Artificial                       |    |
|    | <220>                                  |    |
| 65 | <223> Cebador I gamma                  |    |

|    |                                              |    |
|----|----------------------------------------------|----|
|    | <400> 45                                     |    |
|    | ggccagccca aagccaaccc taccgtg                | 27 |
| 5  | <210> 46                                     |    |
|    | <211> 32                                     |    |
|    | <212> ADN                                    |    |
| 10 | <213> Artificial                             |    |
|    | <220>                                        |    |
| 15 | <223> Cebador J gamma                        |    |
|    | <400> 46                                     |    |
|    | agatagcggc cgcttattag gaacattcgg tt          | 32 |
| 20 | <210> 47                                     |    |
|    | <211> 33                                     |    |
| 25 | <212> ADN                                    |    |
|    | <213> Artificial                             |    |
|    | <220>                                        |    |
| 30 | <223> Cebador K gamma                        |    |
|    | <400> 47                                     |    |
| 35 | gctagtacaa aggggccctc agtgttccca ctg         | 33 |
|    | <210> 48                                     |    |
|    | <211> 34                                     |    |
| 40 | <212> ADN                                    |    |
|    | <213> Artificial                             |    |
| 45 | <220>                                        |    |
|    | <223> Cebador L gamma                        |    |
|    | <400> 48                                     |    |
| 50 | agatagcggc cgcttattat ttccaggtg acag         | 34 |
|    | <210> 49                                     |    |
| 55 | <211> 473                                    |    |
|    | <212> PRT                                    |    |
|    | <213> Artificial                             |    |
| 60 | <220>                                        |    |
|    | <223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado |    |
| 65 | <400> 49                                     |    |

# ES 2 728 854 T3

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

# ES 2 728 854 T3

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 50

5 <211> 1422

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo humanizado

15

<400> 50

# ES 2 728 854 T3

```

atggagtttg gcctgtcctg gctgttcctg gtcgcaatcc tgaagggcgt gcagtgtgaa      60
gtgcagctgc tggagagcgg ggggggactg gtgcagcccg gcgggagtct gagactgtca      120
tgcgccgcta gcgggttcac ttttagctcc tacccaatgg gatgggtcag gcaggcacct      180
ggcaagggac tggagtgggt ggctggcatc gacgatgacg gggattctga caccgatac      240
gctcctgcag tgaagggacg agccaccatt tccagagata actctaaaaa tacagtctat      300
ctgcagatga acagcctgcg agctgaagac actgcagtgt actattgcgc caagcacacc      360
ggaatcggcg ccaattctgc tggcagtatt gatgcttggg ggcaagggaac cctggtcaca      420
gtgtctagtg ctagtacaaa ggggccctca gtgttcccac tggcaccctc aagcaaaagt      480
acttcaggag gaaccgcagc actgggatgt ctggtgaagg actacttccc agagcccgtc      540
actgtgtcat ggaacagcgg agcactgacc agcggcgtcc atacatttcc tgccgtgctg      600
cagtccctctg gactgtactc cctgagttca gtggtcaccg tgccaagctc ctctctgggc      660
actcagacct atatctgcaa cgtgaatcac aagcctagta atacaaaagt cgataagaaa      720
gtggagccaa agagctgtga caaaacacat acttgcccc cttgtcctgc ccagaactg      780
ctgggggggac caagcgtgtt cctgtttcca cccaagccca aagataccct gatgattagc      840
aggacaccag aggtcacttg cgtggctcgtg gatgtgtccc acgaggaccc cgaagtcaag      900
tttaactggg acgtggacgg cgtcgaagtg cataatgcca agacaaaacc cagggaggaa      960
cagtacaaca gcacatatcg cgtcgtgtcc gtcctgactg tgctgcacca ggattggctg     1020
aacggaaaag agtacaagtg caaagtgtct aataaggcac tgcccgcctc tatcgagaaa     1080
acaattagca aggcaaaagg ccagcctcga gaaccacagg tgtacactct gcctccatcc     1140
cgggaggaaa tgactaagaa ccaggtctct ctgacctgtc tggtgaaagg cttctatccc     1200
tcagacatcg ctgtggagtg ggaaagcaat gggcagcctg agaacaatta caagaccaca     1260
ccccctgtgc tggattccga cgggtctttc tttctgtatt ctaagctgac cgtggacaaa     1320
agtcggtggc agcagggaaa tgtcttttagc tgttccgtga tgcacgaagc actgcacaac     1380
cactacactc agaagagcct gtcactgtca cctggaaaat aa                          1422

```

<210> 51

5

<211> 233

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 1)

15

<400> 51

# ES 2 728 854 T3

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

<210> 52

<211> 702

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 1)

<400> 52

10 atggcatgga ttcctctgct gctgcctctg ctgaccctgt gcaccgggag cgaagcctca 60  
tacgaactga cccagccccc tagcgtctcc gtgtctcccg ggcagactgc aaggatcacc 120  
tgcagcggag gaggatccta taccgggtct tactattacg gatggtacca gcagaagcca 180  
ggacaggctc ccgtgacaat gatctattac aacaacaagc ggccttctga cattccagag 240  
cgggttcagcg gatcactgag cggcaccaca aacactctga ccattagcgg ggtgcaggcc 300  
gaggacgaag ctgattatta ctgcggcagt gcagacaata gcgggggatgc cttcggcaca 360  
gggactaaag tgactgtcct gggccagccc aaagccaacc ctaccgtgac actgtttccc 420  
cctagctccg aggaactgca ggcaaataag gccacactgg tctgtctgat cagcgacttc 480  
tatactggag ctgtgactgt cgcttggaag gcagattcta gtccagtga agcagggcgtc 540  
gagactacca caccagtaa gcagtcaaac aacaagtatg ccgcttcaag ctacctgagc 600  
ctgaccccag aacagtggaa atcccaccgg tcctactctt gtcaggtcac tcacgagggc 660  
tcaactgtgg agaaaactgt cgcaccaacc gaatgttcct aa 702

<210> 53

15 <211> 233

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 2)

25 <400> 53

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

# ES 2 728 854 T3

Ser Glu Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser  
20 25 30

Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr  
35 40 45

Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
50 55 60

Val Thr Val Ile Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Glu  
65 70 75 80

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

Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Ala Asp  
100 105 110

Asn Ser Gly Asp Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
115 120 125

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
130 135 140

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
145 150 155 160

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
165 170 175

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
180 185 190

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
195 200 205

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
210 215 220

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
225 230

<210> 54

5 <211> 702

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo humanizado (humanizado 2)

5

<400> 54

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggcatgga ttctctctgct gctgcctctg ctgaccctgt gcaccgggag cgaagcctca | 60  |
| tacgaactga cccagccccc tagcgtctcc gtgtctcccg ggcagactgc aaggatcacc  | 120 |
| tgcagcggag gaggatccta taccgggtct tactattacg gatggtacca gcagaagcca  | 180 |
| ggacaggctc ccgtgacagt gatctattac aacaacaagc ggccttctga cattccagag  | 240 |
| cggttcagcg gatcactgag cggcaccaca aacactctga ccattagcgg ggtgcaggcc  | 300 |
| gaggacgaag ctgattatta ctgcggcagt gcagacaata gcggggatgc cttcggcaca  | 360 |
| gggactaaag tgactgtcct gggccagccc aaagccaacc ctaccgtgac actgtttccc  | 420 |
| cctagctccg aggaactgca ggcaaataag gccacactgg tctgtctgat cagcgacttc  | 480 |
| tatcctggag ctgtgactgt cgcttggaag gcagattcta gtccagtga agcagggcgtc  | 540 |
| gagactacca caccagtaa gcagtcaaac aacaagtatg ccgcttcaag ctacctgagc   | 600 |
| ctgacccccag aacagtggaa atcccaccgg tcctactctt gtcaggtcac tcacgagggc | 660 |
| tcaactgtgg agaaaactgt cgcaccaacc gaatgttcct aa                     | 702 |

10 <210> 55

<211> 473

<212> PRT

15

<213> Artificial

<220>

20 <223> Cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-humano

<400> 55

# ES 2 728 854 T3

Met Ser Pro Leu Val Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ala Leu Pro Gly  
1 5 10 15

Leu Met Ala Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr  
20 25 30

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

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

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

Ala Pro Ala Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln  
85 90 95

ES 2 728 854 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Thr | Val | Arg | Leu | Gln | Leu | Asn | Asn | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Thr | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Lys | His | Thr | Gly | Ile | Gly | Ala | Asn | Ser | Ala | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Ser | Ile | Asp | Ala | Trp | Gly | His | Gly | Thr | Glu | Val | Ile | Val | Ser | Ser | Ala |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |

# ES 2 728 854 T3

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 56

5 <211> 1422

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-humano

15

<400> 56

atgagccacac tcgtctcctc cctcctgctc ctggccgccc tgccagggct gatggcggcc 60  
gtgacgttgg acgagtcgag gggcgccctc cagacgcccg ggggagcgct cagcctcgctc 120  
tgcaaggcct ccgggttcac cttcagcagt tatcccatgg gttgggtgag acaggcgccc 180  
ggcaaggggc tggagtgggt cgctggtatt gatgatgatg gtgatagtga cacaagatac 240  
gcgcggcgag tgaagggccg tgccaccatc tcgagggaca acgggcagag cacagtgagg 300  
ctgcagctga acaacctcag ggctgaggac accggcacct actactgcgc caaacatact 360  
ggatttggtg ctaatagtgc tggtagcatc gacgcatggg gccacgggac cgaagtcac 420  
gtctcctccg ctagtataaa ggggccctca gtgttccac tggcaccctc aagcaaaagt 480  
acttcaggag gaaccgcagc actgggatgt ctggtgaagg actacttccc agagcccgtc 540  
actgtgtcat ggaacagcgg agcactgacc agcggcgctc atacatttcc tgccgtgctg 600  
cagtcctctg gactgtactc cctgagttca gtggtcaccg tgccaagctc ctctctgggc 660  
actcagacct atatctgcaa cgtgaatcac aagcctagta atacaaaagt cgataagaaa 720  
gtggagccaa agagctgtga caaacacat acttgcccc cttgtcctgc ccagaactg 780  
ctgggggggac caagcgtgtt cctgtttcca cccaagccca aagataccct gatgattagc 840  
aggacaccag aggtcacttg cgtggtcgtg gatgtgtccc acgaggaccc cgaagtcaag 900  
tttaactggg acgtggacgg cgtcgaagtg cataatgcca agacaaaacc caggaggagaa 960  
cagtacaaca gcacatatcg cgtcgtgtcc gtcctgactg tgctgcacca ggattggctg 1020  
aacggaaaag agtacaagtg caaagtgtct aataaggcac tgcccgcgcc tatcgagaaa 1080  
acaattagca aggcaaaagg ccagcctcga gaaccacagg tgtacactct gcctccatcc 1140  
cgggaggaaa tgactaagaa ccaggtctct ctgacctgtc tggtgaaagg cttctatccc 1200  
tcagacatcg ctgtggagtg ggaaagcaat gggcagcctg agaacaatta caagaccaca 1260  
ccccctgtgc tggattccga cgggtctttc tttctgtatt ctaagctgac cgtggacaaa 1320  
agtcggtggc agcagggaaa tgtctttagc tgttccgtga tgcacgaagc actgcacaac 1380  
cactacactc agaagagcct gtcactgtca cctggaaaat aa 1422

<210> 57

5

<211> 234

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-humano

15

<400> 57

# ES 2 728 854 T3

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

<210> 58

<211> 705

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-humano

<400> 58

10 atggcctggg ctccctctcct cctggcggtg ctcgcccaca cctcaggttc cctggtgcag 60  
gcagcgctga ctccagccggc ctcggtgtca gcaaacctgg gaggaaccgt caagatcacc 120  
tgctccgggg gtggcagcta tactggaagt tactattatg gctggtacca gcagaagtct 180  
cctggcagtg cccttggtcac tatgatctat tacaacaaca agagaccctc ggacatccct 240  
tcacgattct ccggttccct atccggctcc acaaacacat taaccatcac tgggggtccga 300  
gccgatgacg aggctgtcta tttctgtggg agtcgagaca acagtgggtga tgcatttggg 360  
gccggggacaa ccctgaccgt cctaggccag cccaaagcca accctaccgt gacactgttt 420  
ccccctagct ccgaggaact gcaggcaaat aaggccacac tggctctgtct gatcagcgac 480  
ttctatcctg gagctgtgac tgctcgcttg aaggcagatt ctagtccagt gaaagcaggc 540  
gtcgagacta ccacacccag taagcagtca aacaacaagt atgccgcttc aagctacctg 600  
agcctgaccc cagaacagtg gaaatcccac cggtcctact cttgtcaggt cactcacgag 660  
ggctcaactg tggagaaaac tgtcgcacca accgaatgtt cctaa 705

<210> 59

15 <211> 120

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

25 <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 165)

<400> 59

# ES 2 728 854 T3

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

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

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

Ala Gly Ile Tyr Thr Gly Ser Thr Trp Tyr Gly Ala Ala Val Lys Gly  
50 55 60

Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu Gln  
65 70 75 80

Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys  
85 90 95

Ser Gly Ile Gly Val Asn Ser Ala Ala Phe Ile Asp Ala Trp Gly His  
100 105 110

Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
115 120

<210> 60

5 <211> 5

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

10 <400> 60

Ser Tyr Glu Met Gln  
1 5

15 <210> 61

<211> 15

<212> PRT

20 <213> *Gallus gallus*

<400> 61

Gly Ile Tyr Thr Gly Ser Thr Trp Tyr Gly Ala Ala Val Lys Gly  
25 1 5 10 15

<210> 62

<211> 13

30 <212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 62

Ser Gly Ile Gly Val Asn Ser Ala Ala Phe Ile Asp Ala  
 1 5 10

5 <210> 63

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 165)

<400> 63

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

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr  
 20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile  
 35 40 45

Tyr Asn Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala  
 65 70 75 80

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

20 Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 64

<211> 13

25 <212> PRT

<213> *Gallus gallus*

30 <400> 64

Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly  
 1 5 10

<210> 65

35 <211> 7

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

5 <400> 65

Asn Asn Asn Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 66

10 <211> 9

<212> PRT

15 <213> *Gallus gallus*

<400> 66

Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Thr Ala  
1 5

20 <210> 67

<211> 120

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 582)

<400> 67

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

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

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

Ala Ala Ile Tyr Thr Arg Ser Thr Trp Tyr Gly Ala Ala Val Lys Gly  
50 55 60

Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu Gln  
65 70 75 80

35 Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys

# ES 2 728 854 T3

|    |                                                                                              |     |     |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
|    | 85                                                                                           | 90  | 95  |
|    | Ser Gly Ile Gly Leu Asn Ser Ala Ala Phe Ile Asp Ala Trp Gly His                              |     |     |
|    | 100                                                                                          | 105 | 110 |
|    | Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser                                                              |     |     |
|    | 115                                                                                          | 120 |     |
|    | <210> 68                                                                                     |     |     |
| 5  | <211> 5                                                                                      |     |     |
|    | <212> PRT                                                                                    |     |     |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                                                   |     |     |
| 10 | <400> 68                                                                                     |     |     |
|    | Ser Tyr Glu Met Gln                                                                          |     |     |
|    | 1 5                                                                                          |     |     |
| 15 | <210> 69                                                                                     |     |     |
|    | <211> 15                                                                                     |     |     |
|    | <212> PRT                                                                                    |     |     |
| 20 | <213> <i>Gallus gallus</i>                                                                   |     |     |
|    | <400> 69                                                                                     |     |     |
|    | Ala Ile Tyr Thr Arg Ser Thr Trp Tyr Gly Ala Ala Val Lys Gly                                  |     |     |
| 25 | 1 5 10 15                                                                                    |     |     |
|    | <210> 70                                                                                     |     |     |
|    | <211> 13                                                                                     |     |     |
| 30 | <212> PRT                                                                                    |     |     |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                                                   |     |     |
| 35 | <400> 70                                                                                     |     |     |
|    | Ser Gly Ile Gly Leu Asn Ser Ala Ala Phe Ile Asp Ala                                          |     |     |
|    | 1 5 10                                                                                       |     |     |
|    | <210> 71                                                                                     |     |     |
| 40 | <211> 107                                                                                    |     |     |
|    | <212> PRT                                                                                    |     |     |
| 45 | <213> Artificial                                                                             |     |     |
|    | <220>                                                                                        |     |     |
|    | <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 582) |     |     |
| 50 | <400> 71                                                                                     |     |     |

# ES 2 728 854 T3

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

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr  
20 25 30  
Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile  
35 40 45

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

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala  
65 70 75 80

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

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 72

5

<211> 13

<212> PRT

10 <213> *Gallus gallus*

<400> 72

Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly  
1 5 10

15

<210> 73

<211> 7

20 <212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 73

25

Thr Asn Asn Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 74

30 <211> 9

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

35

<400> 74

Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Thr Ala  
1 5

<210> 75

<211> 121

5 <212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 75

10

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ala Gly Ile Tyr Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly Ala Ala Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Arg Leu  
65 70 75 80

Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Ser Ala Ile Pro Val Asn Ser Ala Gly Ser Ile Asp Ala Trp Gly  
100 105 110

His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
115 120

<210> 76

15

<211> 5

<212> PRT

20 <213> *Gallus gallus*

<400> 76

Ser Tyr Asp Met Asn  
1 5

25

<210> 77

<211> 16

30 <212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 77

35

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

<210> 78  
 <211> 13  
 5 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 10 <400> 78  
 Ser Ala Ile Pro Val Asn Ser Ala Gly Ser Ile Asp Ala  
 1 5 10  
 <210> 79  
 15 <211> 107  
 <212> PRT  
 20 <213> *Gallus gallus*  
 <400> 79  
 Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val  
 1 5 10 15  
 Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr  
 20 25 30  
 Ser Trp His Gln Gln Lys Ser Pro Gly Ser Ala Leu Val Thr Val Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Thr Ser Gly Thr  
 85 90 95  
 Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
 100 105  
 25 <210> 80  
 <211> 13  
 30 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 <400> 80  
 35 Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr Ser  
 1 5 10

<210> 81  
 <211> 7  
 5 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 <400> 81  
 10 Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser  
 1 5  
 <210> 82  
 15 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 20 <400> 82  
 Gly Ser Ala Asp Thr Ser Gly Thr Ala  
 1 5  
 25 <210> 83  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 30 <213> *Gallus gallus*  
 <400> 83

# ES 2 728 854 T3

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

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

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

Ala Gly Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Gly Ala Ala Val Lys Gly  
50 55 60

Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu Gln  
65 70 75 80

Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys  
85 90 95

Ser Gly Ile Gly Phe Asn Ser Ala Gly Ser Ile Asp Ala Trp Gly His  
100 105 110

Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
115 120

<210> 84

5 <211> 5

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

10 <400> 84

Ser Tyr Glu Met Gln  
1 5

15 <210> 85

<211> 15

<212> PRT

20 <213> *Gallus gallus*

<400> 85

Gly Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Gly Ala Ala Val Lys Gly  
25 1 5 10 15

<210> 86

<211> 13

30 <212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 86

Ser Gly Ile Gly Phe Asn Ser Ala Gly Ser Ile Asp Ala  
 1 5 10

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 87

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

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr  
 20 25 30

Ser Trp His Gln Gln Lys Ser Pro Gly Ser Ala Leu Val Thr Val Ile  
 35 40 45

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

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala  
 65 70 75 80

Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ser  
 85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 88

<211> 13

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 88

Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr Ser  
 1 5 10

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 89

Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser  
1 5

5 <210> 90

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Gallus gallus*

<400> 90

Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ser Ala  
15 1 5

<210> 91

<211> 36

20 <212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cebador M gamma

<400> 91

30 agcttgctag cggccacat ggctgggct cctctc 36

<210> 92

35 <211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> Cebador N gamma

45 <400> 92

tctggcggc gctagactca ctaggacgg tcagggtgt c 41

<210> 93

50 <211> 36

<212> ADN

55 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador O gamma

60 <400> 93

agcttgctag cggccacat gagccactc gtctcc 36

<210> 94  
<211> 40  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
10 <220>  
<223> Cebador P gamma  
<400> 94  
15 tctggcggcc gctagactca ccggaggaga cgatgacttc 40  
<210> 95  
20 <211> 1249  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
25 <400> 95

# ES 2 728 854 T3

atatgcggcc gcctttcttg ggcacgccgg gcctgaccgg gtcatacttg tttcctgggc 60  
 tttggggcag ggggtgggct aaggtgacgc aggtggcgcc agccaggcgc acaccaatg 120  
 cccgtgagcc cagacactgg acgctgaacc tcgcgacag ttaagaacct aggggcctct 180  
 gcgccttggg cccagctctg tcccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tcttgacgcc 240  
 agcactaagg gaccatccgt gtttcctctg gtcctagta gcaaatcaac ttcaggggga 300  
 accgcagcac tgggatgtct ggtcaaagac tacttcccag agcccgctac cgtgtcatgg 360  
 aacagcggag cactgactag cggagtccac acctttccag ccgtgctgca gagctccgga 420  
 ctgtactccc tgtctagtgt ggtcacagt ccttcaagct ccctggggac tcagacctat 480  
 atctgcaacg tgaatcacia gccctccaat actaaagtcg acaagaaagt ggaacctaat 540  
 tcttgatgata aaacacatac ttgccccctt tgcctgacac cagagctgct gggaggacct 600  
 agcgtgttcc tgtttccacc caagccaaaa gacaccctga tgattagtcg aaccctgaa 660  
 gtcacatgcg tggtcgtgga cgtgagccac gaggatccag aagtcaagtt caactggtac 720  
 gtggatggcg tcgaggtgca taatgctaag acaaaacccc gggaggaaca gtacaacagt 780  
 acctatagag tcgtgtcagt cctgacagt ctgcatcagg actggctgaa cggaaggaa 840  
 tataagtgca aagtgtccaa taaggccctg cccgctccta tcgagaaaac ttttctaat 900  
 gctaaaggcc agccaaggga accccaggtg tacaccctgc ctccatcacg cgacgagctg 960  
 acaaagaacc aggtcagcct gacttgtctg gtgaaagggt tctatccatc tgatatcgca 1020  
 gtggagtggg aaagtaatgg acagcccag aacaattaca agaccacacc ccctgtgctg 1080  
 gactccgatg gatctttctt tctgtatagc aagctgaccg tggataaatc cagatggcag 1140  
 cagggcaatg tcttttcttg tagtgtgatg cacgaagccc tgcataacca ctacactcag 1200  
 aagtcactgt ccctgtcacc tggaaaatga gtgccacggc cggcaagcc 1249

<210> 96

5 <211> 613

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 96

atatgcggcc gccagaatgg gtcatacttg tttcctgctg caaagagctc caacaaaaca 60  
 atttagaact ttattaagga atagggggaa gctaggaaga aactcaaac atcaagattt 120  
 taaatacgtt tcttggtctc cttgctataa ttatctggga taagcatgct gttttctgtc 180

# ES 2 728 854 T3

|    |                                                                                                                                                       |     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | tgtccctaac atgccctgtg attatccgca aacaacacac ccaagggcag aactttgtta                                                                                     | 240 |
|    | cttaaacacc atcctgtttg cttctttcct caggaaccgt ggccgctcca tccgtcttta                                                                                     | 300 |
|    | tctttcctcc atccgacgaa cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtc tgtctgctga                                                                                     | 360 |
|    | acaacttcta cccccgggag gccaaagggtgc agtggaaagt cgacaacgct ctgcagtctg                                                                                   | 420 |
|    | gcaatagtca ggagtcagtg actgaacagg acagcaagga ttccacctat tctctgagct                                                                                     | 480 |
|    | ccaccctgac actgagcaaa gcagattacg agaagcacia agtctatgcc tgcgaagtca                                                                                     | 540 |
|    | ctcatcaggg gctgtcctca ccagtcacta aaagtttcaa tcggggcgaa tgctaaagtc                                                                                     | 600 |
|    | ggccgtgcaa gcc                                                                                                                                        | 613 |
|    | <210> 97                                                                                                                                              |     |
| 5  | <211> 15                                                                                                                                              |     |
|    | <212> ADN                                                                                                                                             |     |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                      |     |
| 10 | <220>                                                                                                                                                 |     |
|    | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 165) |     |
| 15 | <400> 97                                                                                                                                              |     |
|    | agttatgaga tgcag                                                                                                                                      | 15  |
| 20 | <210> 98                                                                                                                                              |     |
|    | <211> 45                                                                                                                                              |     |
|    | <212> ADN                                                                                                                                             |     |
| 25 | <213> Artificial                                                                                                                                      |     |
|    | <220>                                                                                                                                                 |     |
| 30 | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 165) |     |
|    | <400> 98                                                                                                                                              |     |
| 35 | ggtatttaca ctggtagcac atgttacggg gcggcggtga agggc                                                                                                     | 45  |
|    | <210> 99                                                                                                                                              |     |
|    | <211> 39                                                                                                                                              |     |
| 40 | <212> ADN                                                                                                                                             |     |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                      |     |
| 45 | <220>                                                                                                                                                 |     |
|    | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 165) |     |
| 50 | <400> 99                                                                                                                                              |     |

|    |                                                                                                                                                       |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | agtggtattg gtgtaatatg tgctgctttt atcgacgca                                                                                                            | 39 |
|    | <210> 100                                                                                                                                             |    |
| 5  | <211> 39                                                                                                                                              |    |
|    | <212> ADN                                                                                                                                             |    |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                      |    |
| 10 | <220>                                                                                                                                                 |    |
|    | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 165) |    |
| 15 | <400> 100                                                                                                                                             |    |
|    | tccgggggtg gcagctatgg tggaagttac tattatggc                                                                                                            | 39 |
| 20 | <210> 101                                                                                                                                             |    |
|    | <211> 21                                                                                                                                              |    |
|    | <212> ADN                                                                                                                                             |    |
| 25 | <213> Artificial                                                                                                                                      |    |
|    | <220>                                                                                                                                                 |    |
| 30 | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 165) |    |
|    | <400> 101                                                                                                                                             |    |
| 35 | aacaacaaca agagaccctc g                                                                                                                               | 21 |
|    | <210> 102                                                                                                                                             |    |
|    | <211> 27                                                                                                                                              |    |
| 40 | <212> ADN                                                                                                                                             |    |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                      |    |
| 45 | <220>                                                                                                                                                 |    |
|    | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 165) |    |
| 50 | <400> 102                                                                                                                                             |    |
|    | gggagtgacg acaacagtgg tactgca                                                                                                                         | 27 |
|    | <210> 103                                                                                                                                             |    |
| 55 | <211> 360                                                                                                                                             |    |
|    | <212> ADN                                                                                                                                             |    |
| 60 | <213> Artificial                                                                                                                                      |    |
|    | <220>                                                                                                                                                 |    |
| 65 | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 165)         |    |

|    |                                                                                                                                                       |     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | <400> 103                                                                                                                                             |     |
|    | gccgtgacgt tggacgagtc cgggggcggc ctccagacgc ccggaggagg gctcagcctc                                                                                     | 60  |
|    | gtctgcaagg cctccgggtt caccttcagc agttatgaga tgcagtgggt gcgacaggcg                                                                                     | 120 |
|    | cccggcaagg ggctggagtg ggtcgctggt atttacctg gtagcacatg gtacggggcg                                                                                      | 180 |
|    | gcggtgaagg gccgtgccac catctcgagg gacaacgggc agagcacagt gaggctgcag                                                                                     | 240 |
|    | ctgaacaacc tcagggtga ggacaccgcc atctactact gcgccaaaag tggatttggt                                                                                      | 300 |
|    | gttaatagtg ctgcttttat cgacgcatgg ggccacggga ccgaagtcac cgtctcctcc                                                                                     | 360 |
| 5  | <210> 104                                                                                                                                             |     |
|    | <211> 321                                                                                                                                             |     |
|    | <212> ADN                                                                                                                                             |     |
| 10 | <213> Artificial                                                                                                                                      |     |
|    | <220>                                                                                                                                                 |     |
| 15 | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 165)         |     |
|    | <400> 104                                                                                                                                             |     |
|    | gcgctgactc agccggcctc ggtgtcagcg aaccaggag aaaccgtcaa gatcacctgc                                                                                      | 60  |
|    | tccgggggtg gcagctatgg tggaagttac tattatggct ggtaccagca gaaggcacct                                                                                     | 120 |
|    | ggcagtgcc ctgtcactgt gatctataac aacaacaaga gaccctcgaa catcccttca                                                                                      | 180 |
|    | cgattctccg gttccctatc cggctccaca aacacattaa ccatcactgg ggtccgagcc                                                                                     | 240 |
|    | gatgacgagg ctgtctatct ctgtgggagt gcagacaaca gtggtactgc atttggggcc                                                                                     | 300 |
| 20 | gggacaaccc tgaccgtcct a                                                                                                                               | 321 |
|    | <210> 105                                                                                                                                             |     |
|    | <211> 15                                                                                                                                              |     |
| 25 | <212> ADN                                                                                                                                             |     |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                      |     |
| 30 | <220>                                                                                                                                                 |     |
|    | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 582) |     |
| 35 | <400> 105                                                                                                                                             |     |
|    | agttatgaga tgcag                                                                                                                                      | 15  |
|    | <210> 106                                                                                                                                             |     |
| 40 | <211> 45                                                                                                                                              |     |
|    | <212> ADN                                                                                                                                             |     |

|    |                                                                                                                                                       |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <213> Artificial                                                                                                                                      |    |
|    | <220>                                                                                                                                                 |    |
| 5  | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 582) |    |
|    | <400> 106                                                                                                                                             |    |
| 10 | gctatttaca ctcgtacac atggtacggg gcggcgggtga agggc                                                                                                     | 45 |
|    | <210> 107                                                                                                                                             |    |
|    | <211> 39                                                                                                                                              |    |
| 15 | <212> ADN                                                                                                                                             |    |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                      |    |
| 20 | <220>                                                                                                                                                 |    |
|    | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 582) |    |
| 25 | <400> 107                                                                                                                                             |    |
|    | agtggatttg gtctaatag tgctgcttt atcgacga                                                                                                               | 39 |
|    | <210> 108                                                                                                                                             |    |
| 30 | <211> 39                                                                                                                                              |    |
|    | <212> ADN                                                                                                                                             |    |
| 35 | <213> Artificial                                                                                                                                      |    |
|    | <220>                                                                                                                                                 |    |
| 40 | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 582) |    |
|    | <400> 108                                                                                                                                             |    |
| 45 | tccgggggtg gcagctatgg tggaagttac tattatggc                                                                                                            | 39 |
|    | <210> 109                                                                                                                                             |    |
|    | <211> 21                                                                                                                                              |    |
| 50 | <212> ADN                                                                                                                                             |    |
|    | <213> Artificial                                                                                                                                      |    |
|    | <220>                                                                                                                                                 |    |
| 55 | <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 582) |    |
|    | <400> 109                                                                                                                                             |    |
| 60 | accaacaaca agagaccctc g                                                                                                                               | 21 |
|    | <210> 110                                                                                                                                             |    |
| 65 | <211> 27                                                                                                                                              |    |

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 582)

10 <400> 110

gggagtgcag acaacagtgg tactgca 27

<210> 111

15 <211> 360

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 582)

25 <400> 111

gccgtgacgt tggacgagtc cgggggcggc ctccagacgc ccggaggagc gctcagcctc 60

gtctgcaagg cctccgggtt caccatgagc agttatgaga tgcagtgggt gcgacaggcg 120

cccggcaagg ggctggagtg ggtcgctgct atttacctc gtagcacatg gtacggggcg 180

gcggtgaagg gccgtgccac catctcgagg gacaacgggc agagcacagt gaggctgcag 240

ctgaacaacc tcagggctga ggacaccggc acctactact gcgccaaaag tggtattggt 300

cttaatagtg ctgcttttat cgacgcatgg ggccacggga ccgaagtcac cgtctcctcc 360

30 <210> 112

<211> 321

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

40 <223> Secuencia de bases que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo quimérico de pollo-ratón (clon n.º 582)

<400> 112

45

# ES 2 728 854 T3

|    |                                                                   |     |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|
|    | gcgctgactc agccggcctc ggtgtcagca aaccaggag aaaccgtcaa gatcacctgc  | 60  |
|    | tccgggggtg gcagctatgg tggaagttac tattatggct ggtaccagca gaaggcacct | 120 |
|    | ggcagtggcc ctgtcactgt gatctatacc aacaacaaga gaccctcgaa catcccttca | 180 |
|    | cgattctccg gtccctatc cggctccaca aacacattaa ccatcactgg ggtccgagcc  | 240 |
|    | gatgacgagg ctgtctatct ctgtgggagt gcagacaaca gtggtactgc atttggggcc | 300 |
|    | gggacaaccc tgaccgtcct a                                           | 321 |
|    | <210> 113                                                         |     |
| 5  | <211> 15                                                          |     |
|    | <212> ADN                                                         |     |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                        |     |
| 10 | <400> 113                                                         |     |
|    | agttacgaca tgaac                                                  | 15  |
| 15 | <210> 114                                                         |     |
|    | <211> 48                                                          |     |
|    | <212> ADN                                                         |     |
| 20 | <213> <i>Gallus gallus</i>                                        |     |
|    | <400> 114                                                         |     |
| 25 | ggtatttaca gtggtagtag cacatactac ggggcggcgg tgaagggc              | 48  |
|    | <210> 115                                                         |     |
|    | <211> 39                                                          |     |
| 30 | <212> ADN                                                         |     |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                        |     |
| 35 | <400> 115                                                         |     |
|    | agtgctattc ctgttaatag tgctgtagc atcgacgca                         | 39  |
|    | <210> 116                                                         |     |
| 40 | <211> 39                                                          |     |
|    | <212> ADN                                                         |     |
| 45 | <213> <i>Gallus gallus</i>                                        |     |
|    | <400> 116                                                         |     |
| 50 | tccgggggtg gcagttatgg tggaagtat tactatagc                         | 39  |
|    | <210> 117                                                         |     |
|    | <211> 21                                                          |     |
| 55 | <212> ADN                                                         |     |

|    |                                                                     |     |
|----|---------------------------------------------------------------------|-----|
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                          |     |
|    | <400> 117                                                           |     |
| 5  | tacaacaaca agagaccctc g                                             | 21  |
|    | <210> 118                                                           |     |
| 10 | <211> 27                                                            |     |
|    | <212> ADN                                                           |     |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                          |     |
| 15 | <400> 118                                                           |     |
|    | gggagtgcag acaccagtgg tactgca                                       | 27  |
| 20 | <210> 119                                                           |     |
|    | <211> 363                                                           |     |
|    | <212> ADN                                                           |     |
| 25 | <213> <i>Gallus gallus</i>                                          |     |
|    | <400> 119                                                           |     |
|    | gccgtgacgt tggacgagtc cggggggcggc ctccagacgc ccggggggagc gctcagcctc | 60  |
|    | gtctgcaagg cctccgggtt caccttcagc agttacgaca tgaactgggt gcgacagggc   | 120 |
|    | cccggcaagg ggctggaatg ggctcgctgtt atttacagtg gtagtagcac atactacggg  | 180 |
|    | gcggcggtga agggccgtgc caccatctcg agggacaacg ggcagagcac actgaggctg   | 240 |
|    | cagctgaaca acctcagggc tgaggacacc ggcactctact actgcgcaa aagtgtctatt  | 300 |
|    | cctgttaata gtgctggtag catcgacgca tggggccacg ggaccgaagt catcgtctcc   | 360 |
| 30 | tcc                                                                 | 363 |
|    | <210> 120                                                           |     |
|    | <211> 321                                                           |     |
| 35 | <212> ADN                                                           |     |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                                          |     |
| 40 | <400> 120                                                           |     |
|    | gcgctgactc agccggcctc ggtgtcagcg aaccaggag aaaccgtcaa gatcacctgc    | 60  |
|    | tccgggggtg gcagttatgg tggaagttat tactatagct ggcaccagca gaagtctcct   | 120 |
|    | ggcagtgcctc ttgtcactgt gatctattac aacaacaaga gaccctcgga catcccttca  | 180 |
|    | cgattctccg gttccctatc cggctccaca aacacattaa ccatcactgg ggtccgagcc   | 240 |
|    | gatgacgagg ctgtctatatt ctgtgggagt gcagacacca gtgggtactgc atttggggcc | 300 |
|    | gggacaaccc tgaccgtcct a                                             | 321 |

|    |                                                   |    |
|----|---------------------------------------------------|----|
|    | <210> 121                                         |    |
|    | <211> 15                                          |    |
| 5  | <212> ADN                                         |    |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                        |    |
| 10 | <400> 121                                         |    |
|    | agttatgaga tgcag                                  | 15 |
|    | <210> 122                                         |    |
| 15 | <211> 45                                          |    |
|    | <212> ADN                                         |    |
| 20 | <213> <i>Gallus gallus</i>                        |    |
|    | <400> 122                                         |    |
| 25 | ggtatttaca gtggtagcac atggtacggg gcggcggtga agggc | 45 |
|    | <210> 123                                         |    |
|    | <211> 39                                          |    |
| 30 | <212> ADN                                         |    |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                        |    |
|    | <400> 123                                         |    |
| 35 | agtggatttg gtttaatatg tgctggtagc atcgacgca        | 39 |
|    | <210> 124                                         |    |
| 40 | <211> 39                                          |    |
|    | <212> ADN                                         |    |
|    | <213> <i>Gallus gallus</i>                        |    |
| 45 | <400> 124                                         |    |
|    | tccgggggtg gcagttatgg tggaagttat tactatagc        | 39 |
| 50 | <210> 125                                         |    |
|    | <211> 21                                          |    |
|    | <212> ADN                                         |    |
| 55 | <213> <i>Gallus gallus</i>                        |    |
|    | <400> 125                                         |    |
| 60 | tacaacaaca agagaccctc g                           | 21 |
|    | <210> 126                                         |    |
|    | <211> 27                                          |    |
| 65 | <212> ADN                                         |    |

<213> *Gallus gallus*

<400> 126

5 gggagtgcag acaacagtgg tagtgca 27

<210> 127

10 <211> 360

<212> ADN

<213> *Gallus gallus*

15 <400> 127

gccgtgacgt tggacgagtc cgggggcggc ctccagacgc ccgggggagc gctcagcctc 60

gtctgcaagg cctccgggtt caccttcagc agttatgaga tgcagtgggt gcgacaggcg 120

cccggcaagg ggctggaatg ggtcgctggt atttacagtg gtagcacatg gtacggggcg 180

gcggtgaagg gccgtgccac catctcgagg gacaacgggc agagcacagt aaggctgcag 240

ctgaacaacc tcagggtctga ggacaccggc acctactact gcgccaaaag tggatttgggt 300

tttaatatgt ctggtagcat cgacgcatgg ggccacggga ccgaagtcac cgtctcctcc 360

20 <210> 128

<211> 321

<212> ADN

25 <213> *Gallus gallus*

<400> 128

30 gcgctgactc agccggcctc ggtgtcagcg aaccaggag aaaccgtcaa gatcacctgc 60

tccgggggtg gcagttatgg tggaaagtat tactatagct ggcaccagca gaagtctcct 120

ggcagtgccc ttgtcactgt gatctattac aacaacaaga gaccctcgga catcccttca 180

cgattctccg gttccctatc cggctccaca aacacattaa ccatcactgg ggtccgagcc 240

gatgacgagg ctgtctatct ctgtgggagt gcagacaaca gtggtagtgc atttggggcc 300

gggacaaccc tgaccgtcct a 321

35

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-semaforina 3A que contiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera mostradas en (A) o fragmento de anticuerpo del mismo que contiene una región de unión a antígeno del mismo:  
 5 (A) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2; y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, y  
 10 una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4; CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5; y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6.
- 15 2. Anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo de los mismos.
3. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1 ó 2.  
 20
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que la composición es para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, septicemia, cáncer, coagulación intravascular diseminada, enfermedad del sistema nervioso central o periférico, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, enfermedad infecciosa o enfermedad alérgica.  
 25
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el cáncer es cáncer intestinal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cerebral, melanoma, cáncer de células renales, leucemia, linfoma, linfoma de células T, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer de ovarios, cáncer de esófago, cáncer de hígado, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de las vías urinarias, cáncer de próstata, coriocarcinoma, cáncer de faringe o cáncer de laringe.  
 30
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la coagulación intravascular diseminada acompaña a al menos uno seleccionado del grupo que consiste en septicemia, leucemia aguda, cáncer sólido, separación prematura de placenta implantada de manera normal, embolia de líquido amniótico, traumatismo, lesión por quemadura, enfermedad de tejido conjuntivo, choque, aneurisma aórtico, hepatitis aguda, cirrosis hepática, pancreatitis aguda, rabdomiólisis, trombosis y enfermedad infecciosa grave.  
 35
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la enfermedad del sistema nervioso central o periférico es dolor neuropático, lesión de la médula espinal o enfermedad neurodegenerativa.  
 40
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, degeneración de la sustancia negra, síndrome de Shy-Drager, atrofia olivopontocerebelosa o degeneración espinocerebelosa.  
 45
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo I, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico o esclerosis múltiple.  
 50
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la enfermedad inflamatoria es septicemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, artritis, hepatitis, espondiloartritis o enfermedad de Sjogren.  
 55
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la enfermedad infecciosa es enfermedad infecciosa bacteriana, encefalitis, meningitis, endocarditis, hepatitis C, gripe, síndrome respiratorio agudo grave, neumonía, septicemia, lesión o traumatismo por quemadura, enfermedad infecciosa.
- 60 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la enfermedad alérgica es rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial o alergia alimentaria.
13. Método para medir proteína Sema 3A, que comprende medir proteína Sema 3A en una muestra usando un inmunoensayo con el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1 ó 2.  
 65

14. Kit para medir proteína Sema 3A, que comprende el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1 ó 2.
- 5 15. Método para medir proteína Sema 3A según la reivindicación 13,  
medir proteína Sema 3A mediante inmunoensayo de tipo sándwich,  
usar el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1 como anticuerpo de captura, y  
10 usar el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo mostrado en (B) o (C) como anticuerpo primario:  
(B) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 61, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62, y  
una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 64, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 65, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 66;  
(C) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 69, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70, y  
una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 72, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 74.
- 30 16. Método para medir proteína Sema 3A según la reivindicación 13,  
medir proteína Sema 3A mediante inmunoensayo de tipo sándwich,  
usar el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo mostrado en (D) o (E) como anticuerpo de captura:  
40 (D) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 78, y  
una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 80, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 81, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 82;  
45 (E) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 84, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 85, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 86, y  
una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 89, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 90, y  
usar el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1 como anticuerpo primario.
- 55 17. Kit según la reivindicación 14,  
que se usa para medir proteína Sema 3A mediante inmunoensayo de tipo sándwich,  
60 que contiene el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1 como anticuerpo de captura, y  
que contiene el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo mostrado en (B) o (C) como anticuerpo primario:  
65 (B) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos

mostrada en SEQ ID NO: 60, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 61, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62, y

5 una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 64, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 65, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 66;

10 (C) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 69, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70, y

15 una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 72, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 74.

18. Kit según la reivindicación 14,

que se usa para medir proteína Sema 3A mediante inmunoensayo de tipo sándwich,

20 que contiene el anticuerpo anti-semaforina 3A o fragmento de anticuerpo del mismo mostrado en (D) o (E) como anticuerpo de captura:

25 (D) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 78, y

30 una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 80, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 81, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 82;

(E) una región variable de cadena pesada que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 84, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 85, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 86, y

35 una región variable de cadena ligera que contiene CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88, CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 89, y CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 90, y

40 que contiene el anticuerpo anti-Sema 3A o fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1 como anticuerpo primario.

FIG. 1

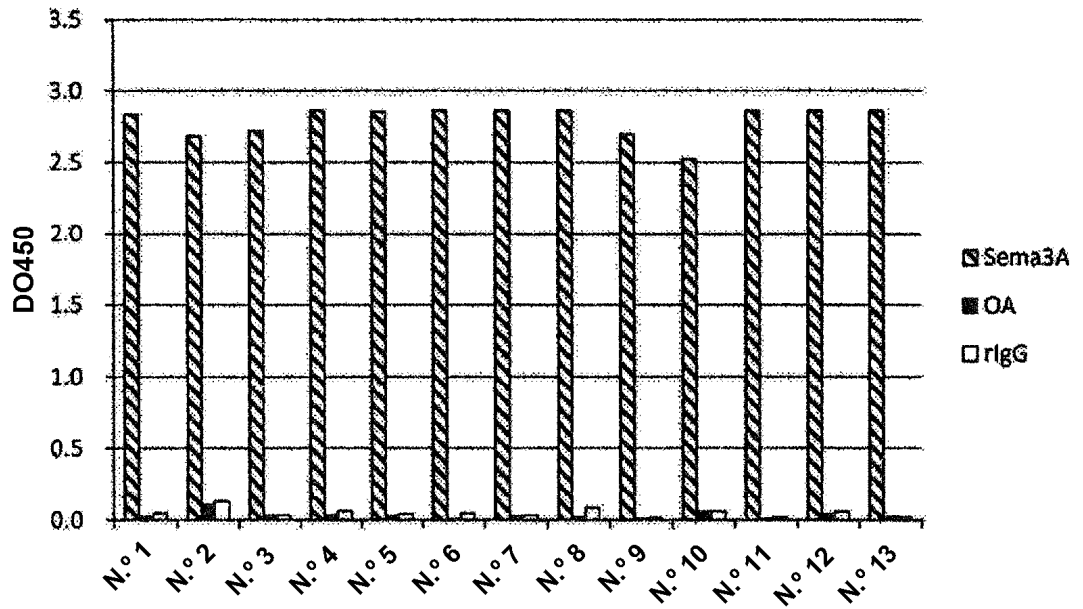


FIG. 2

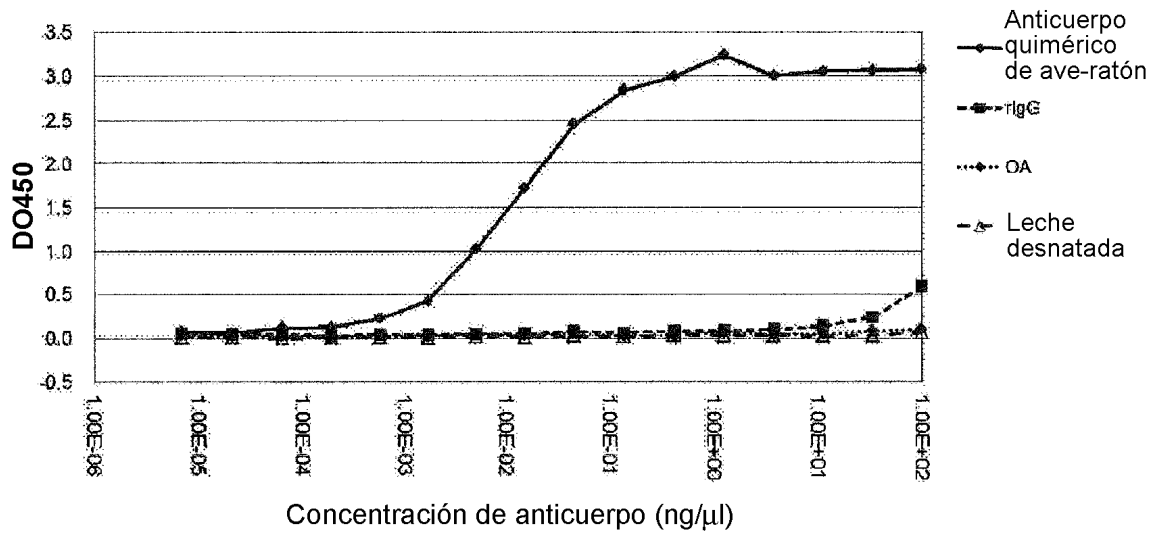
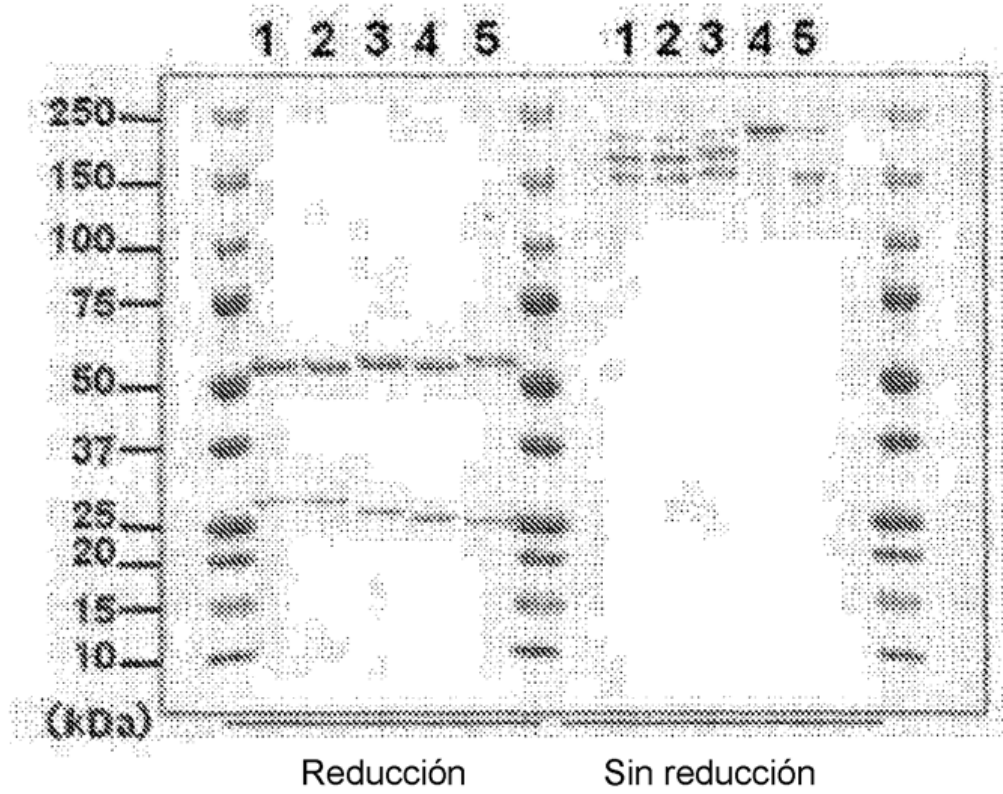


FIG. 3



- 1: Anticuerpo humanizado (humanizado 1)
- 2: Anticuerpo humanizado (humanizado 2)
- 3: Anticuerpo quimérico de ave-humano
- 4: Anticuerpo quimérico de ave-ratón
- 5: Anticuerpo quimérico de ave-ratón CL18M (+) (control)

FIG. 4

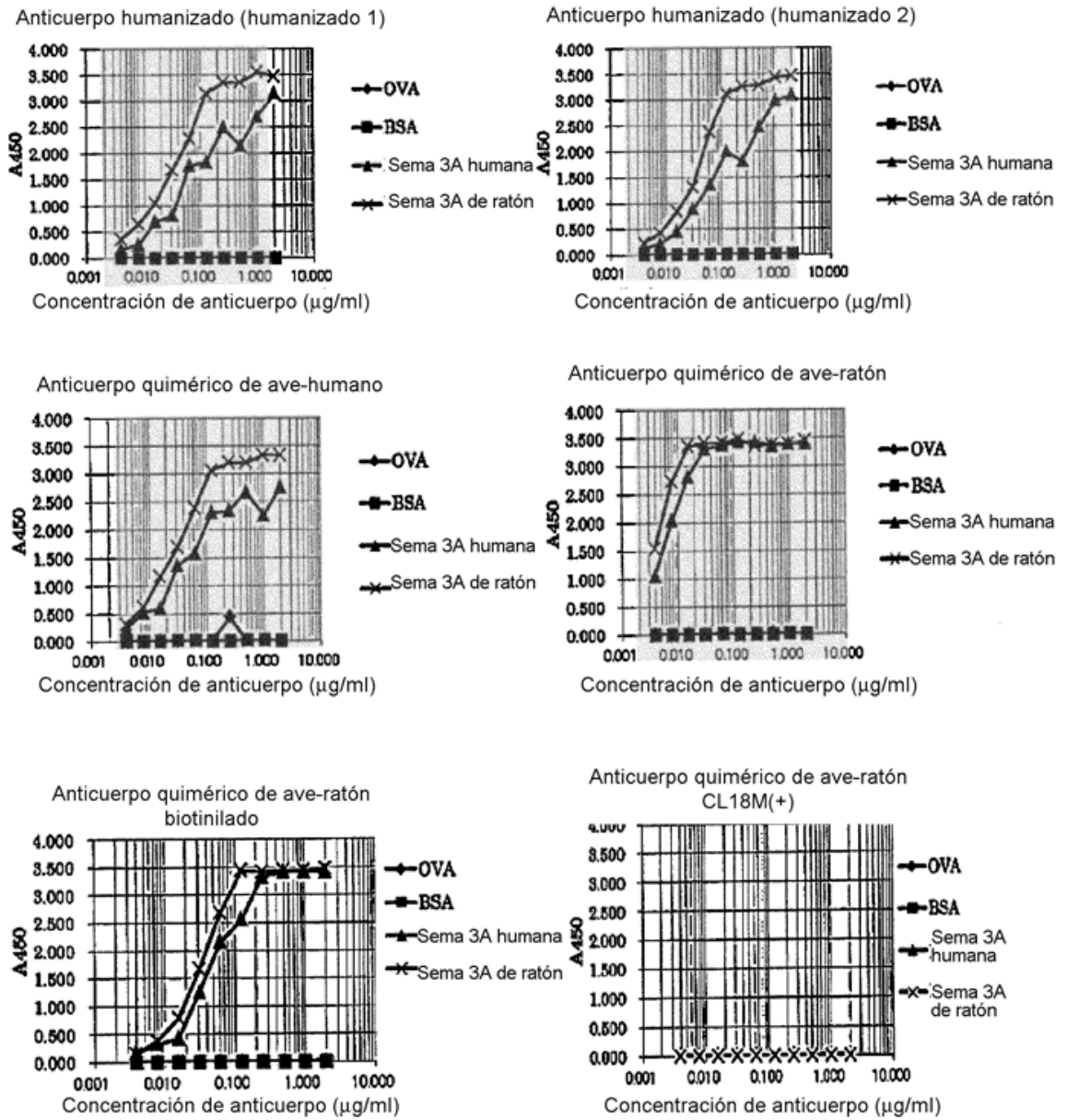
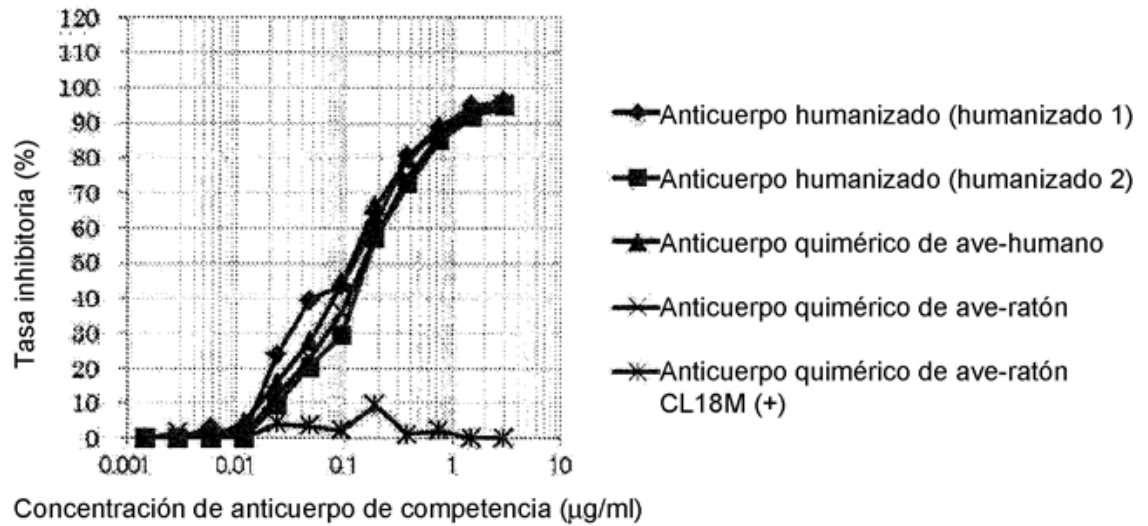


FIG. 5

Caso de antígeno de Sema 3A de ratón



Caso de antígeno de Sema 3A humana

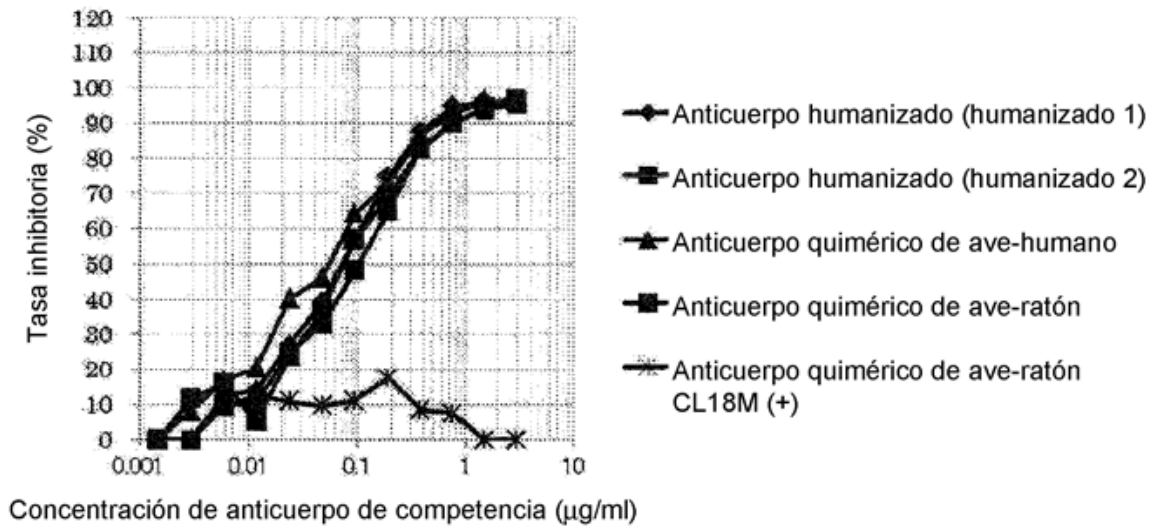


FIG. 6

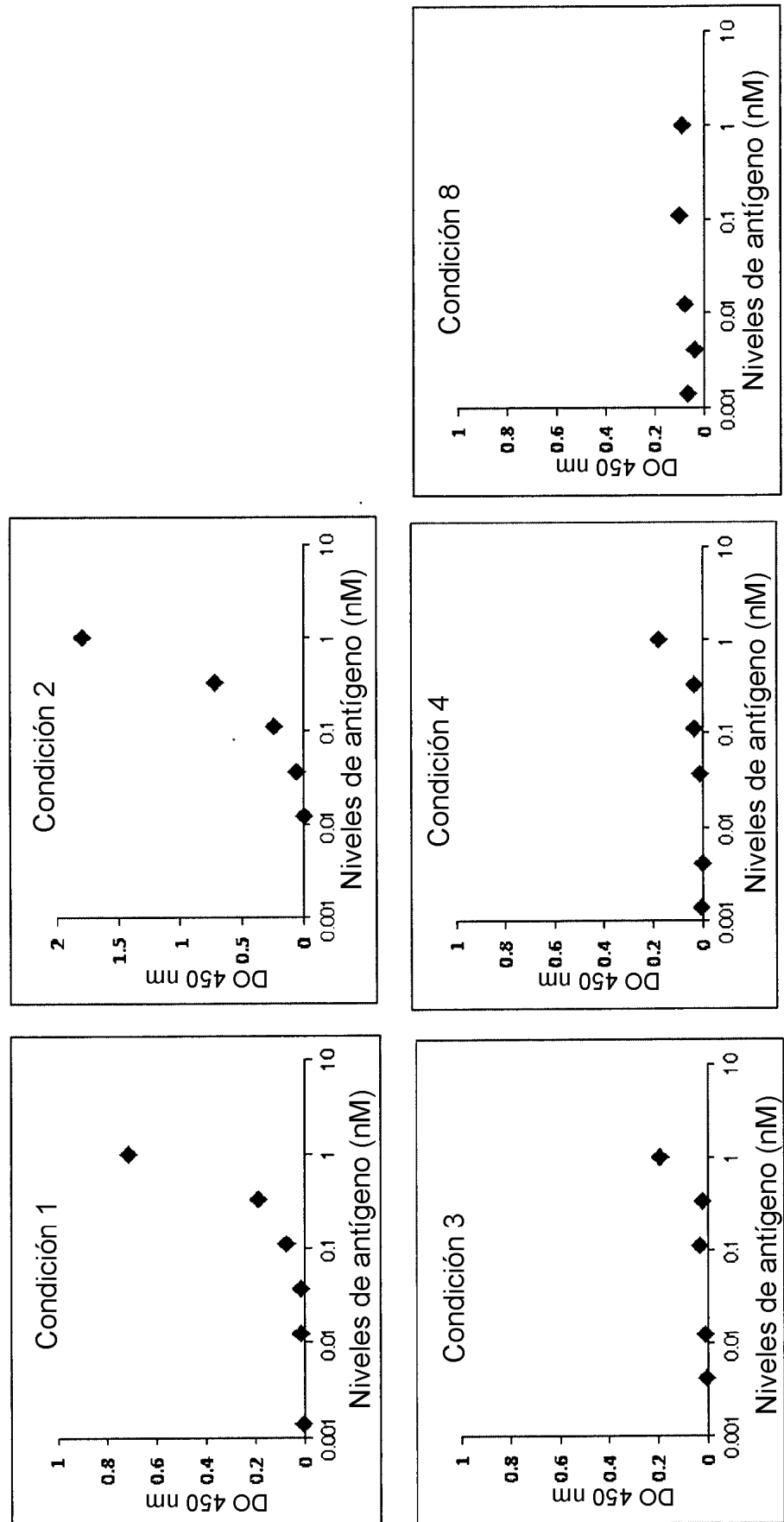


FIG. 7

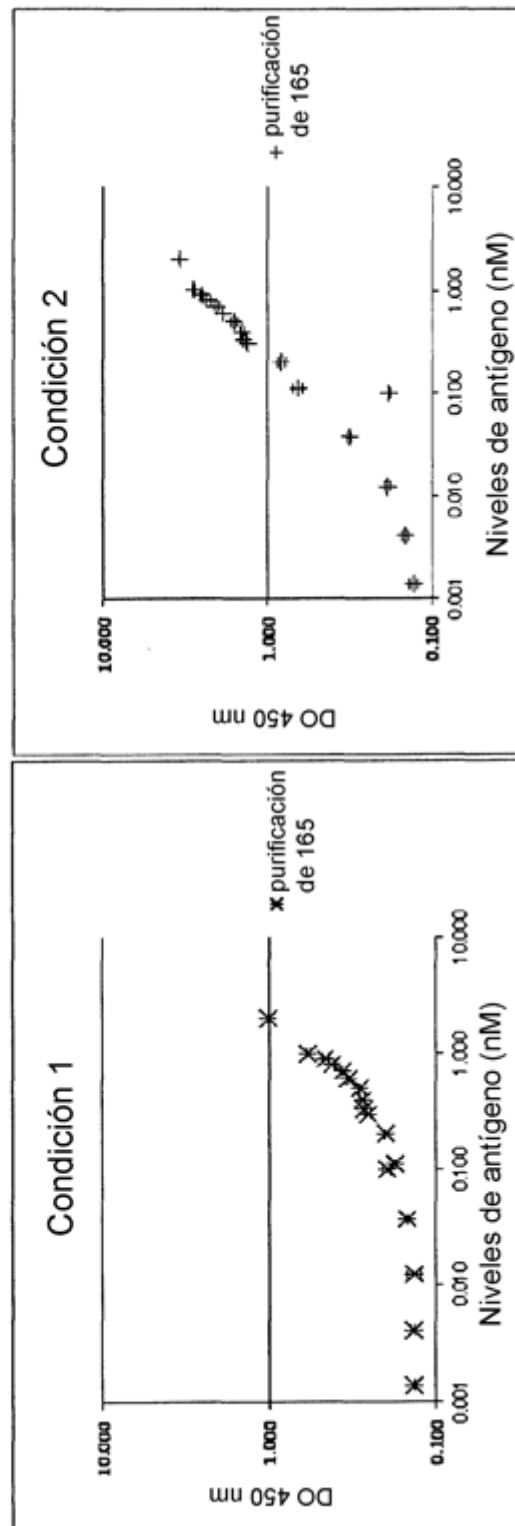


FIG. 8

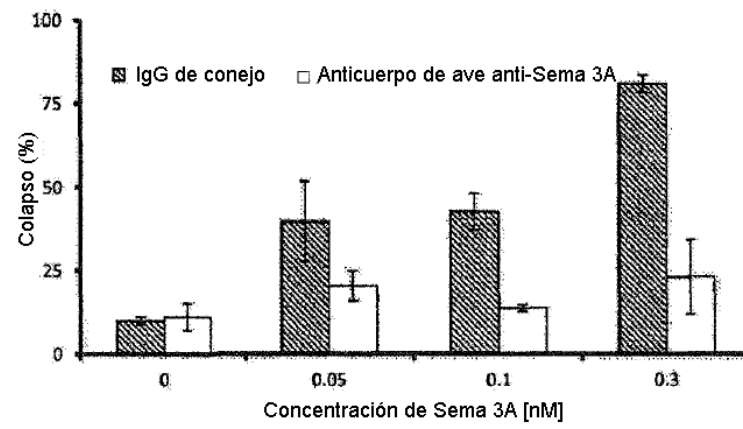


FIG. 9

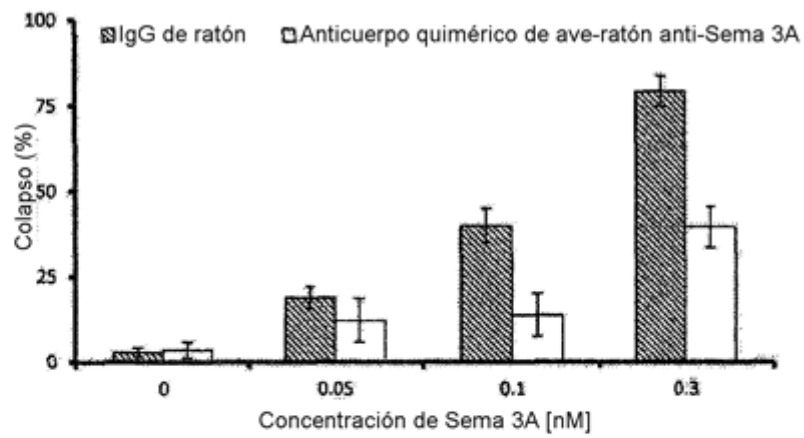


FIG. 10

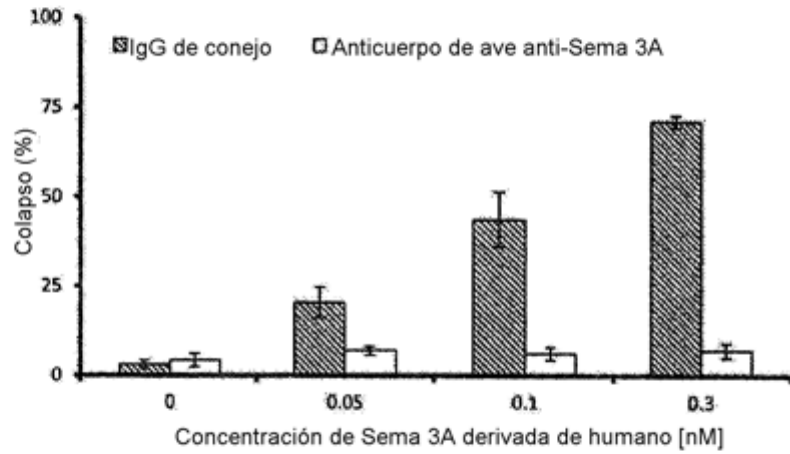


FIG. 11

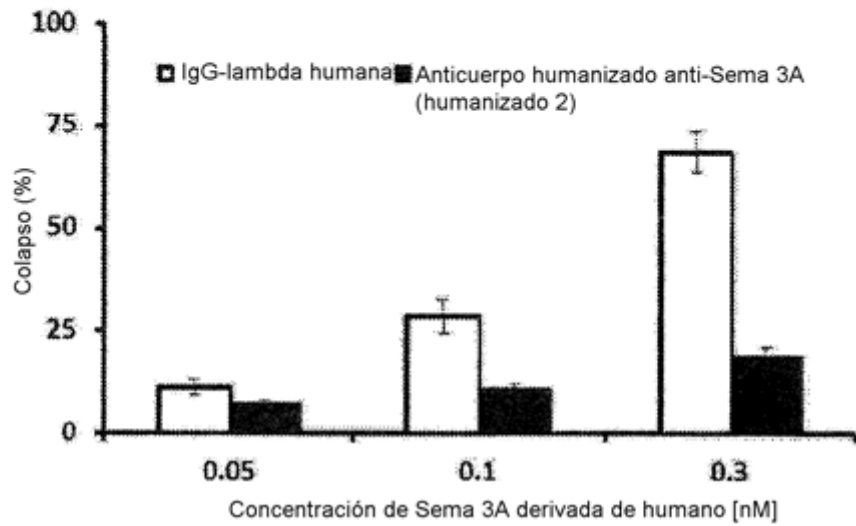
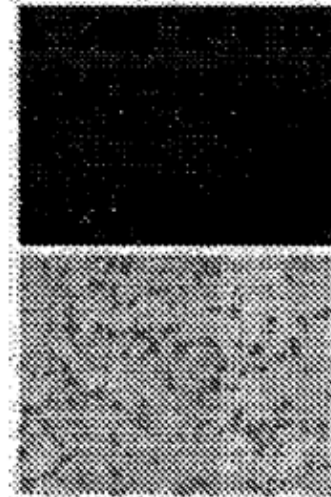


FIG. 12



Células COS-7 de tipo natural  
Adición de Sema3A humana



Células COS-7 que  
expresan NRP1  
Adición de Sema3A humana

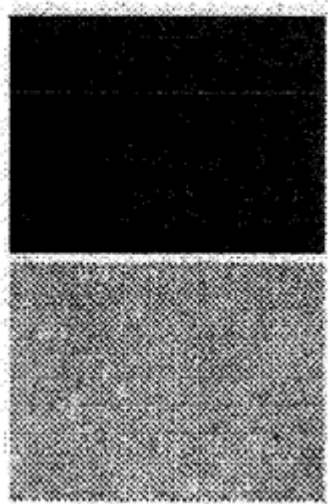


Células COS-7 que  
expresan NRP1  
Adición de Sema3A humana  
e IgG de conejo

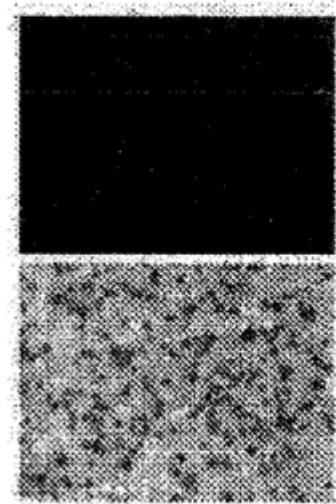


Células COS-7 que  
expresan NRP1  
Adición de Sema3A humana  
y anticuerpo de ave anti-Sema3A

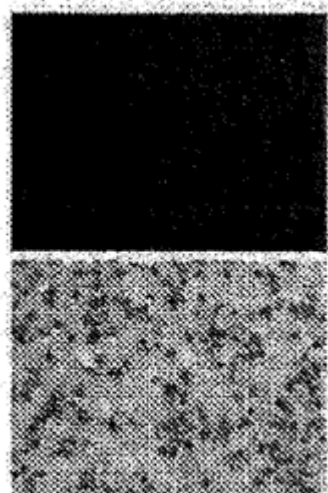
FIG. 13



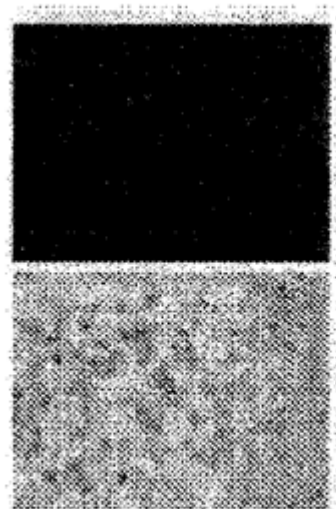
Células COS-7 de tipo natural  
Adición de Sema3A humana



Células COS-7 que  
expresan NRP1  
Adición de Sema3A humana

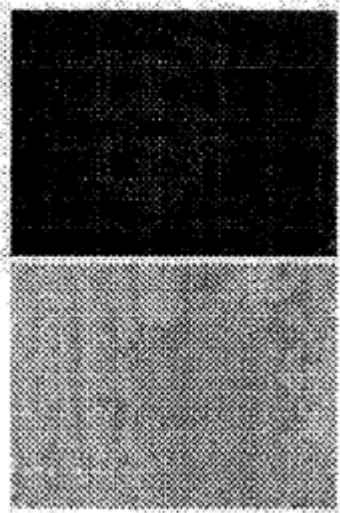


Células COS-7 que  
expresan NRP1  
Adición de Sema3A humana  
e IgG de conejo

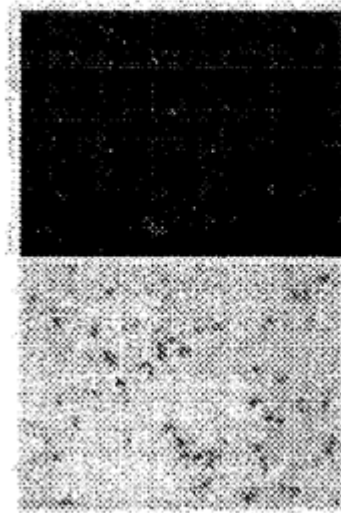


Células COS-7 que  
expresan NRP1  
Adición de Sema3A humana  
y anticuerpo quimérico de  
ave-ratón anti-Sema3A

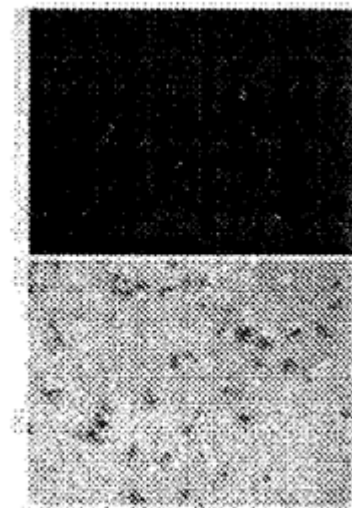
FIG. 14



**Células COS-7 de tipo natural  
Adición de Sema3F humana**



**Células COS-7 que  
expresan NRP1  
Adición de Sema3F humana**



**Células COS-7 que  
expresan NRP1  
Adición de Sema3F humana  
e IgG de conejo**



**Células COS-7 que  
expresan NRP1  
Adición de Sema3F humana  
y anticuerpo quimérico de  
ave-ratón anti-Sema3A**

FIG. 15

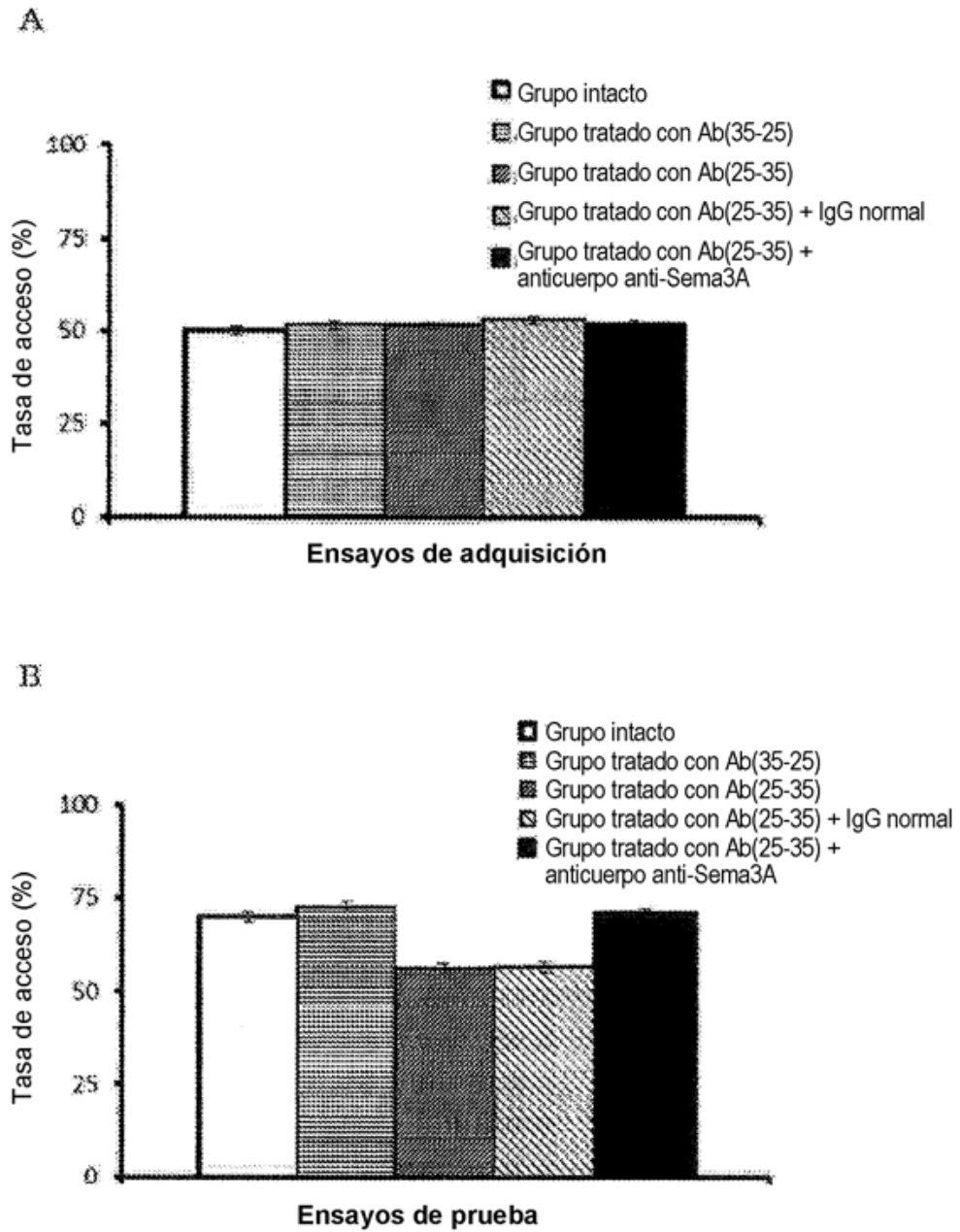


FIG. 16

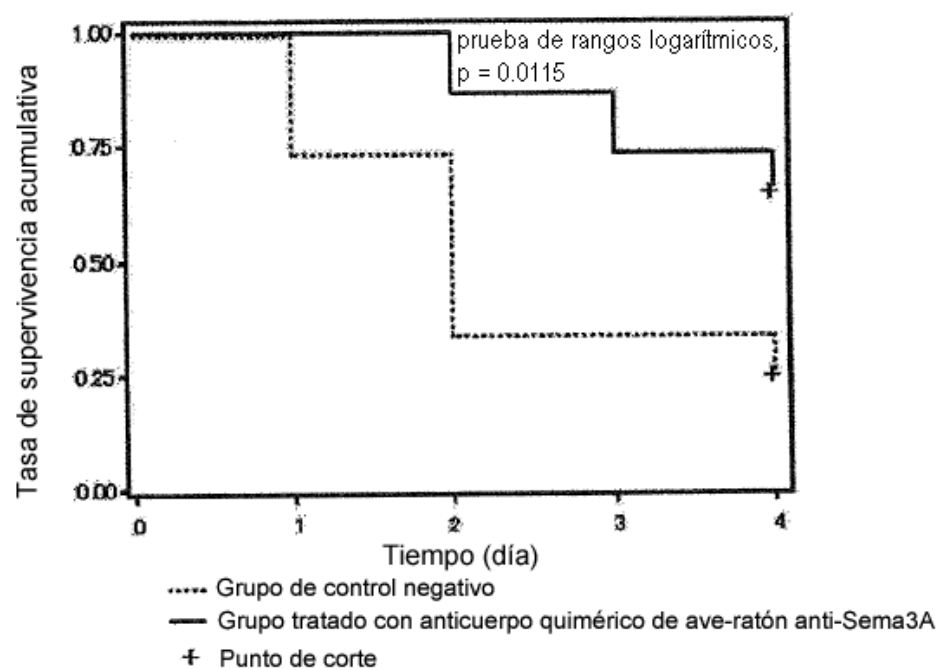


FIG. 18

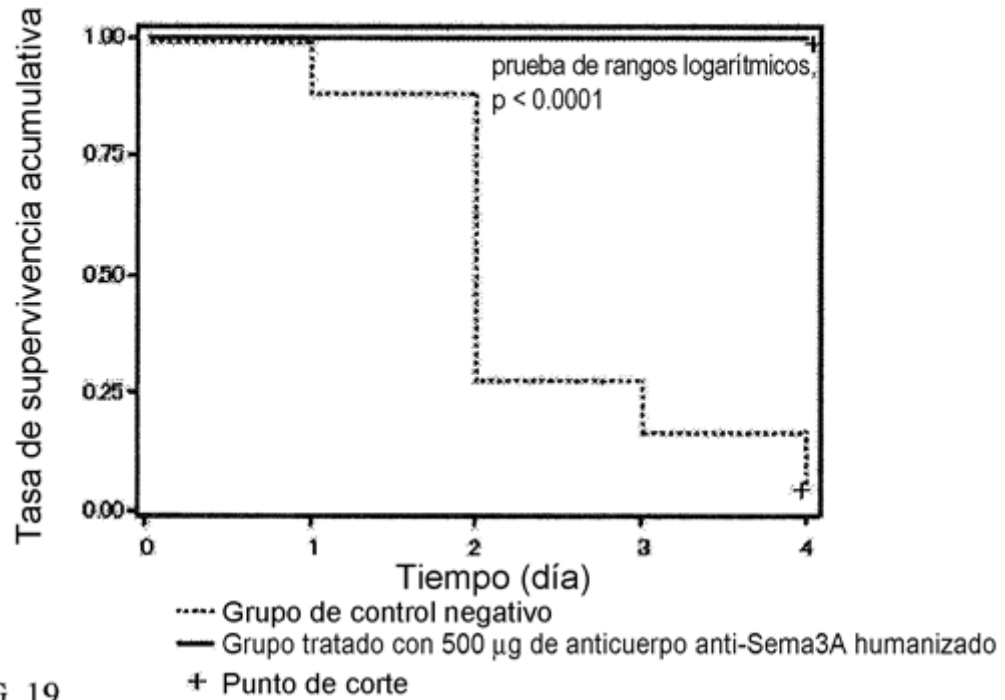


FIG. 19

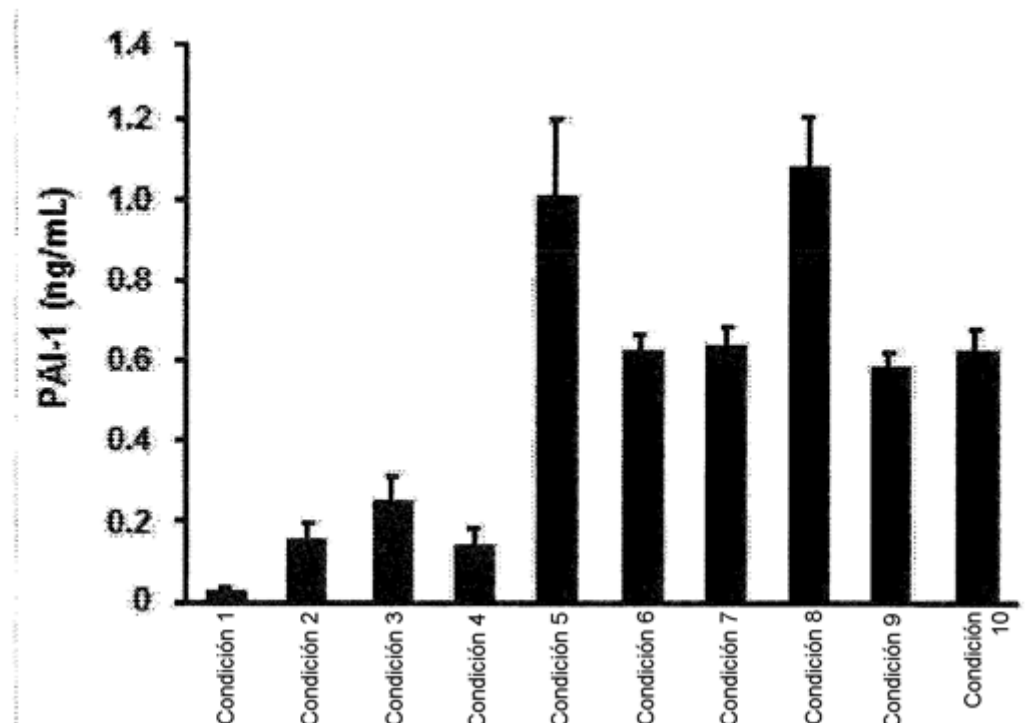


FIG. 20

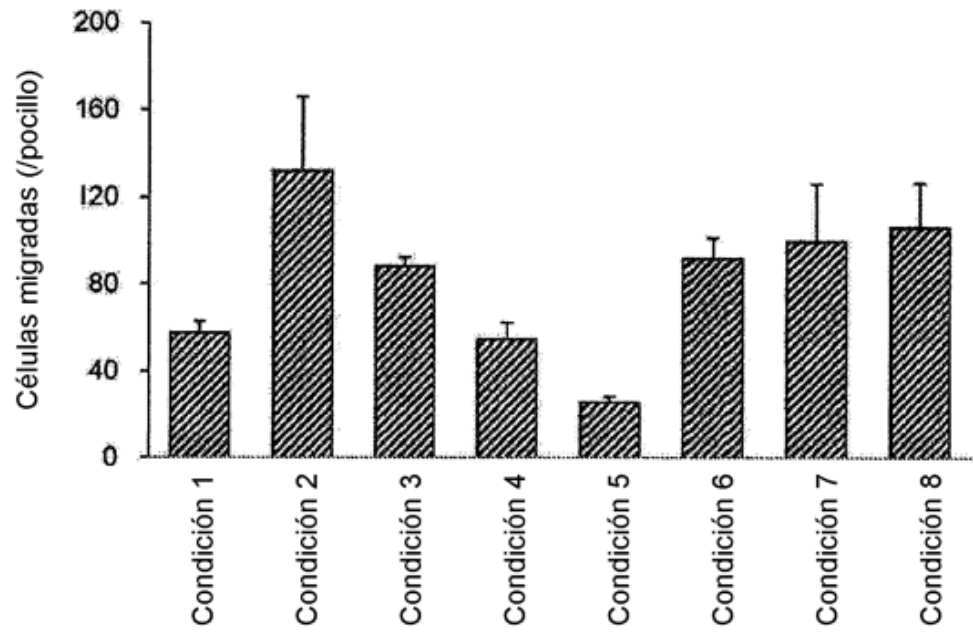


FIG. 21

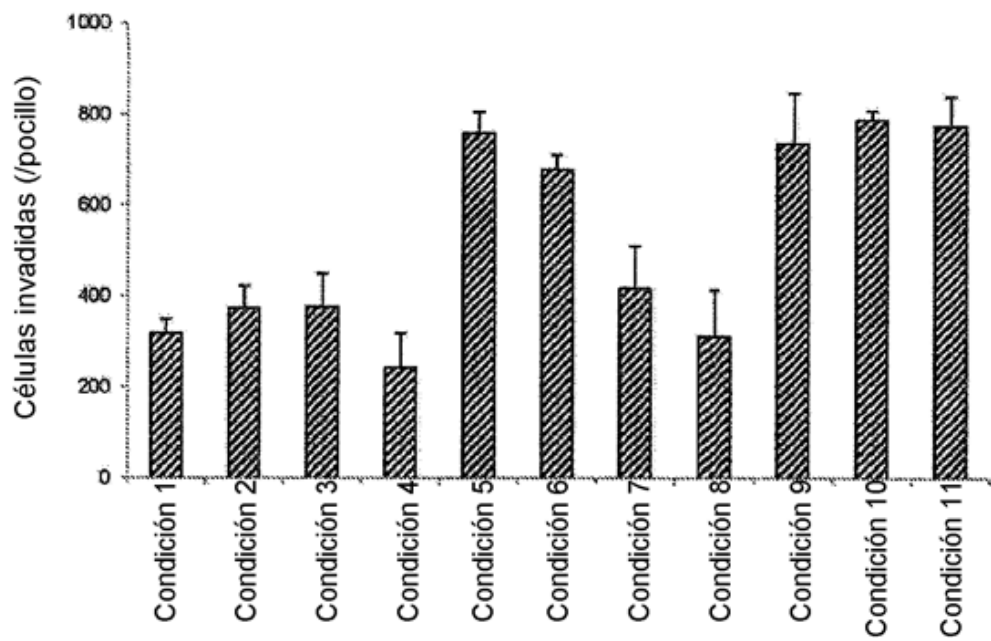


FIG. 22

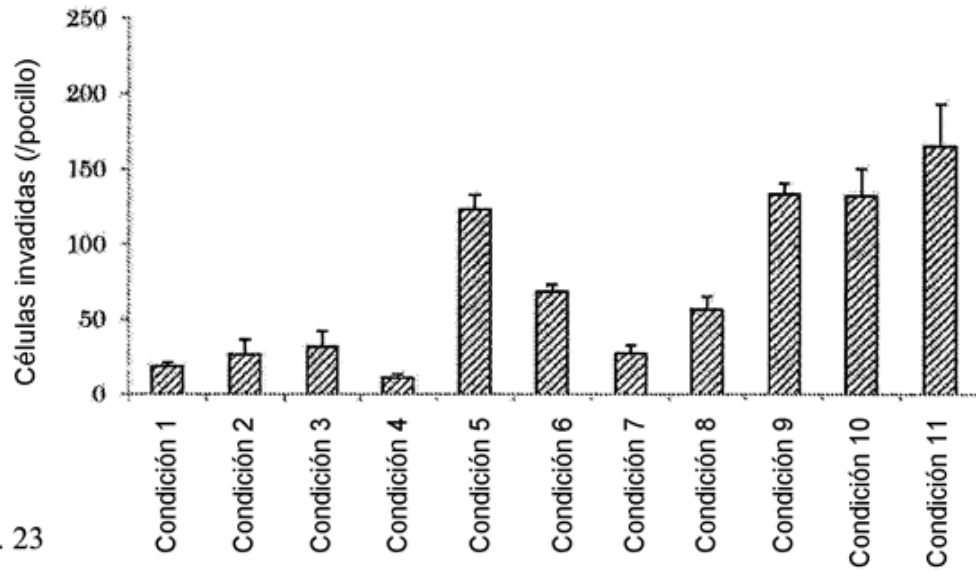


FIG. 23

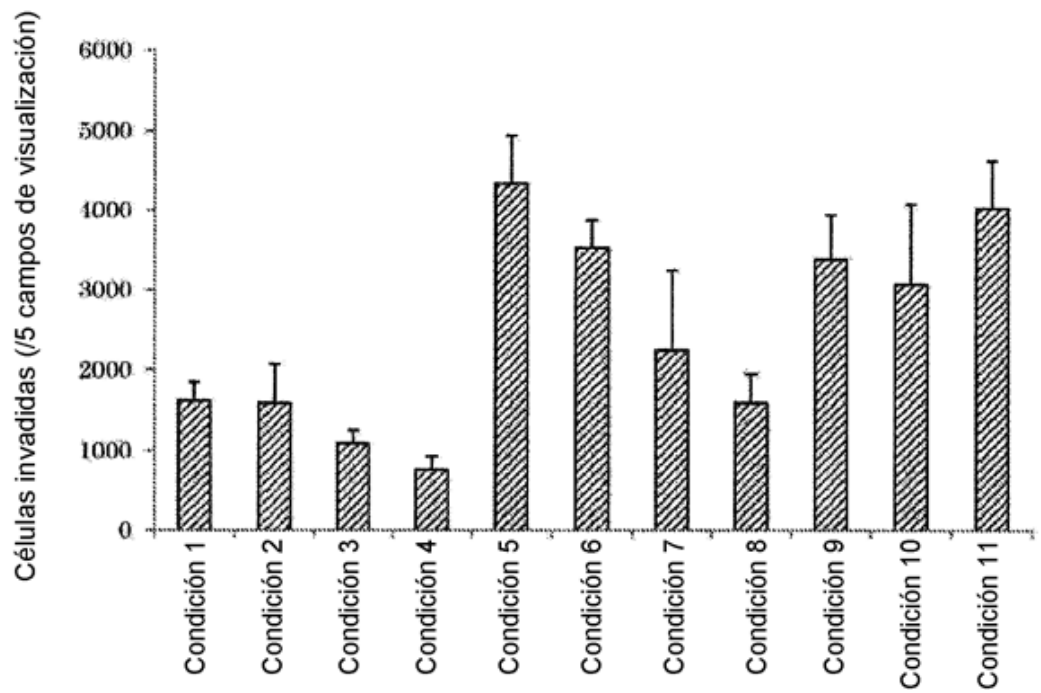


FIG. 24

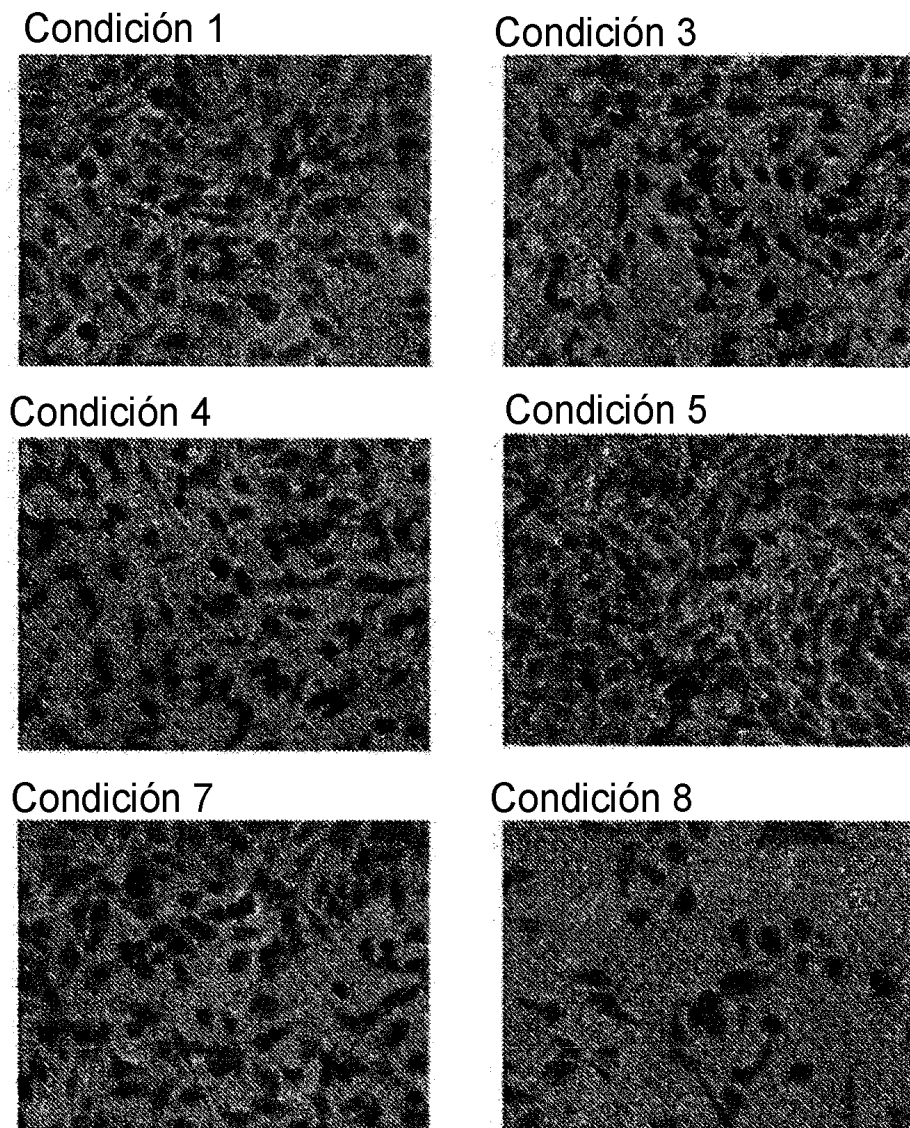


FIG. 25

