

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 051**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2009** E 12153376 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** EP 2450381

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

30 Prioridad:

31.12.2008 IN 2730MU2008

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

05.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 740 051 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales anti-RHD

Campo de la invención

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

Antecedentes y estado de la técnica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Descripción de la invención

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

una región variable de cadena pesada que es al menos un 80% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 2 y tiene una primera, segunda y tercera CDR que son idénticas a las respectivas primera, segunda y tercera CDR de la SEQ ID NO: 10, y una región variable de cadena ligera que es al menos 80% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 12 y tiene una primera, segunda y tercera CDR que son idénticas a las primera, segunda y tercera CDR respectivas de la SEQ ID NO: 12, en donde las CDR del anticuerpo monoclonal son determinadas usando la herramienta IMGT/V-QUEST.

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

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

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

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

15 Las SEQ ID NO: 10 y 12 son las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal anti-RhD denominado aquí como RhD3 y se describe a continuación con más detalle.

20 Los anticuerpos de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención comprenden, por lo tanto, regiones variables de cadena pesada y cadena ligera que tienen una primera, segunda y tercera regiones determinantes de complementariedad (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) que son idénticas o sustancialmente idénticas a la primera, segunda y tercera regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) del anticuerpo RhD3.

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

30 En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal anti-RhD aislado comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que son al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente 100% idénticas a las regiones variables respectivas de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo RhD3. Por lo tanto, en esta realización, el anticuerpo comprende:

35 una región variable de cadena pesada que es al menos 90%, 95%, 98% o 100% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 10 y tiene una primera, segunda y tercera CDR que son idénticas a la respectiva primera, segunda y tercera CDR de la SEQ ID NO: 10, y una región variable de cadena ligera que es al menos 90%, 95%, 98% o 100% idéntica a la región variable de la SEQ ID NO: 12 y tiene una primera, segunda y tercera CDR que son idénticas a las respectivas primera, segunda y tercera CDR de la SEQ ID NO: 12.

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

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

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

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

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

15 Los ejemplos de secuencias de ácido nucleico incluyen las secuencias de codificación relevantes de las SEQ ID NOs: 9 y 11, secuencias que son las secuencias de codificación para, respectivamente, las SEQ ID NOs: 10 y 12 de aminoácidos. Por lo tanto, por ejemplo, si el anticuerpo comprende regiones variables idénticas a las regiones variables de las SEQ ID NOs: 2 y 4 (las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-RhD designado RhD1), entonces un ejemplo de secuencia de ácido nucleico podría comprender las secciones de las SEQ ID NOs: 1 y 3 que codifican dichas regiones variables. Alternativamente, tales secuencias de ácido nucleico podrían modificarse para una expresión optimizada (es decir, transcripción y/o traducción) en la célula huésped deseada, por ejemplo, a través de técnicas conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, la optimización de la secuencia de ácido nucleico nativa puede comprender uno o más de: optimización de la distribución de GC y estiramientos de AT/GC (para mejorar la estabilidad del ARNm); eliminación de motivos inhibidores (tales como señales poliA prematuras); eliminación de sitios de empalme crípticos (para evitar un empalme alternativo e incorrecto del ARNm); optimización de la estructura secundaria del ARNm (para evitar que las horquillas apretadas posiblemente detengan la traducción); optimización de los marcos de lectura abiertos (para evitar marcos de lectura secundarios o alternativos); y optimización del uso de codones (para evitar codones raros que pueden hacer más lenta la traducción).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 3 es un mapa del vector plásmido pCB3;

La Figura 4 es un mapa del vector plásmido pCB11;

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

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

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

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

Las secuencias que son 48 en número se proporcionan en el listado de secuencias acompañante.

El listado de secuencias también se proporciona por separado en forma electrónica.

Ejemplos

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

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

Transformación de EBV

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

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

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

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

Fusión celular

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

Subclonación de hibridomas.

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

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

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

Tabla 1. Designación de anticuerpos anti-RhD

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

15

Aislamiento de ARN

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

Síntesis de la primera cadena

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

25 Hidrólisis de ARN

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

Cola del ADNc de la primera cadena

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

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

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

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

40 Para todas las cadenas:

5'-GACTGAATTC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'

Cebadores inversos (específicos del gen):

Para cadenas gamma:

5'-ACTG GAATTC GGTGCTTTATTTCCATGCTGG-3 '

5'-ACTG GAATTC GTACGTGCCAAGCATCCTCG-3 '

Para cadenas kappa:

5 5'-ACTG GAATTC AGAGGCCAAAGGATGGGAGG-3 '

5'-GACT GAATTC CTGGAAGTGGAGGAGCAGGTGG-3'

Para cadenas lambda:

5'-GACTGAATTCCTGGGA TCCTGCAGCTC-3'

5'-ACTGGAA TTCGGGGTGAGGGTTGAGAACC-3'

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

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

Los productos de PCR purificados se ligaron usando el kit de ligación rápida (NEB) en el vector de clonación pBluescript (Stratagene) cortado con EcoRV. Las células bacterianas DH5 α se transformaron con el ADN resultante y se diseminaron en placas LB suplementadas con 40 μ g/mL de ampicilina y se trataron previamente con 50 μ L de Xgal de 20 mg/mL y 25 μ L de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) de 200 mg/mL. Las colonias se seleccionaron en azul/blanco por la presencia de un inserto.

20 Aislamiento de ADN plasmídico y secuenciación

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

25 Codificación de RhD1, RhD2 y RhD3 y secuencias de aminoácidos

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

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

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

las regiones variables se determinaron restando las regiones constantes; y

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Alineaciones de secuencias de aminoácidos de RhD1-RhD3

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

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

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

Vectores de expresion

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

pCB3

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

Tabla 2 - Componentes del vector de expresión pCB3

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

- 10 pCB11

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

Tabla 3 - Componentes del vector de expresión pCB11

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

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

Inserción de genes de inmunoglobulina recombinante en vectores de expresión

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

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

HC de RhD1:

10 Cebador directo específico de gen (GSP):

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCC-3'

HC de RhD2:

GSP directo:

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCC-3'

15 HC de RhD3:

GSP directo:

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACACACTTTGCTACACACTCC-3'

El cebador inverso utilizado para todas las cadenas pesadas:

5'-TGACGAATTCCACTCATTACCCGGAGACAGG-3'

20 LC de RhD1-RhD2:

GSP directo:

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGCCTGGGCTCTGCTATTC-3'

cebador inverso:

5'-ACTGGAATTCGAACCTATGAACATTCTGTAGGGG-3'

25 LC de RhD3:

GSP directo:

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCG-3'

Cebador inverso:

5'-GACTGAATTCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3'

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

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

ES 2 740 051 T3

4°C mantener

Construcción de la variante de IgG3 del anticuerpo RhD1

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

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

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

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

Directo:

5'-ATCGTCTAGAGTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC-3'

Inverso:

20 5'-TGACGAATTCCACTCATTACCCGGAGACAGG-3'

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

Directo:

5'-ATCGTCTAGAGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCC-3'

Inverso:

25 5'-GATGCTAGCTGAGGAGACGGTGATCGTGG-3'

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

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

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

30 Vectores de expresión que contienen genes de anticuerpos clonados

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

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

5

Optimización del gen

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

10 Clonación de genes optimizados de RhD1 en vectores de expresión

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

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

HC optimizada de RhD1:

Directo:

5'-ATCG TCTAGA GCCACCATGGACTGGACCTG-3'

20 Inverso:

5'-ATC GGGATCC TCATCACTTGCCGGGGGAC-3'

LC optimizada de RhD1:

Directo:

5'-ATCG TCTAGA GCCACCATGGCCTGGGCC-3'

25 Inverso:

5'-ATCG GGATCC TCATCAGCTGCACTCGGTGGGG-3'

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

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

30

Cultivo celular

Medios de cultivo

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

35

Tabla 4 - Medios de cultivo

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

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

Medios de congelación

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

5

Tabla 5 - Componentes de los medios de congelación

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

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

Mantenimiento de las células

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

Densidad celular y mediciones de viabilidad.

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

Transfección estable y amplificación en metotrexato (MTX)

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

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

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

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

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

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

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

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

15 Clonación de células individuales

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

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

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

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

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

Tabla 7 - Nombre designado para los grupos transfectados.

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

40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Purificación de anticuerpos

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

Ensayo de cuantificación anti-D mediante hemaglutinación

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

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

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

Ensayo de citometría de flujo

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

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

25 Ensayo de ADCC

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

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

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

en la que

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

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

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

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

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

Resultados del ensayo de hemaglutinación y ADCC

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

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

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

Formulaciones

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

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

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

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

- 25 Listado de secuencias

<110> BHARAT SERUMS AND VACCINES LTD. DAFTARY, Gautam Vinod KAUNDINYA, John CINEK, Tomas

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-RHD

<130> PCT-ANTID-01

<140> PCT/IN2009/000741

ES 2 740 051 T3

<141> 2009-12-24
 <150> 2730/MUM/2008
 <151> 2008-12-31
 <160> 48
 5 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 1440
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1440)
 <220>
 <221> sig_péptido
 15 <222> (1)..(57)
 <220>
 <221> Región_V
 <222> (58)..(448)
 <220>
 20 <221> Región_C
 <222> (449)..(1437)
 <400> 1

atg gac tgg acc tgg agg ttc ctc ttt gtg gtg gca gca gct aca ggt	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtc cag tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag	96
Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc atc ttc	144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ile Phe	
35 40 45	
aga acc tat gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Arg Thr Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg atg gga ggg atc atc cct atg ttt ggt aca gta aac tac gca	240
Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Val Asn Tyr Ala	
65 70 75 80	
cag aag ttc cag ggc aga gtc acg att agc gcg gac aaa tcc acg agc	288

ES 2 740 051 T3

Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser		
			85						90					95			
aca	gcc	tat	atg	gaa	ctg	agc	aga	ctg	aga	tct	gag	gac	acg	gcc	gtg		336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val		
			100					105					110				
tat	tac	tgt	gcg	agg	ccg	cct	tcc	ggg	ggt	tgt	ggt	ggt	gac	tgc	tca		384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Pro	Pro	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser		
		115					120					125					
cgg	agg	ggc	tac	tac	tac	gcc	atg	gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg		432
Arg	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr		
	130					135					140						
atc	acc	gtc	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg		480
Ile	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu		
145					150					155					160		
gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc		528
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys		
				165					170					175			
ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca		576
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser		
			180					185					190				
ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc		624
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser		
		195					200					205					
tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc		672
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser		
	210					215					220						
ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac		720
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn		
	225				230					235					240		
acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	gtt	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac		768
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His		
			245						250					255			
aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc		816
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		
			260					265					270				
ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc		864
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
		275					280					285					
cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag		912
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
	290					295					300						
gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag		960
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
	305				310					315					320		
aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc		1008
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
			325						330					335			
gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag		1056
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		

ES 2 740 051 T3

340	345	350	
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc			1104
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
355	360	365	
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc			1152
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
370	375	380	
cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg			1200
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
385	390	395	400
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat			1248
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
405	410	415	
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc			1296
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
420	425	430	
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg			1344
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
435	440	445	
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg			1392
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
450	455	460	
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga			1440
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
465	470	475	

<210> 2

<211> 479

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

ES 2 740 051 T3

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Pro Ser Gly Gly Cys Gly Gly Asp Cys Ser
 115 120 125

Arg Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 130 135 140

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 165 170 175

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 180 185 190

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 195 200 205

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 210 215 220

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 225 230 235 240

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 245 250 255

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 260 265 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 275 280 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 290 295 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 305 310 315 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 325 330 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 340 345 350

ES 2 740 051 T3

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 355 360 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 370 375 380

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 385 390 395 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 405 410 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 435 440 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 3

<211> 708

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(708)

<220>

10 <221> sig_péptido

<222> (1)..(57)

<220>

<221> Región_V

<222> (58)..(388)

15 <220>

<221> Región_C

<222> (389)..(705)

<400> 3

ES 2 740 051 T3

atg gcc tgg gct ctg cta ttc ctc acc ctc ctc act cag ggc aca ggg 48
Met Ala Trp Ala Leu Leu Phe Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly
1 5 10 15

tcc tgg gcc cag tct gcc ctg act caa cct gcc tcc gtg tct ggg tct 96
Ser Trp Ala Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser
20 25 30

cct gga cag tcg atc acc atc tcc tgc agt gga agc agc agt gac gtt 144
Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Val
35 40 45

ggg ggt tat aag tat gtc tcc tgg tac caa caa cac cca ggc aaa gcc 192
Gly Gly Tyr Lys Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala
50 55 60

ccc caa ctc atg att tat gat gtc aat aat cgg ccc tca ggg gtt tct 240
Pro Gln Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser
65 70 75 80

aat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc 288
Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile
85 90 95

tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc agc tca tat 336
Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr
100 105 110

aca agc agc agc act cga gtg ttc ggc gga ggg acg aag ctg acc gtc 384
Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
115 120 125

cta ggt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc cca ccc tcc 432
Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser
130 135 140

tct gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt 480
Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser
145 150 155 160

gac ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc 528
Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser
165 170 175

ccc gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac 576
Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn
180 185 190

aac aag tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg cct gag cag tgg 624
Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp
195 200 205

aag tcc cac aaa agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc 672
Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr
210 215 220

gtg gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tag 708
Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 4

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 740 051 T3

Met Ala Trp Ala Leu Leu Phe Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Ser Trp Ala Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser
 20 25 30

Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Val
 35 40 45

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

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

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

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

Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 5

<211> 1440

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1440)

<220>

<221> sig_péptido

<222> (1)..(57)

<220>

5 <221> Región_V

<222> (58)..(448)

<220>

<221> Región_C

<222> (449)..(1437)

10 <400> 5

ES 2 740 051 T3

atg gac tgg acc tgg agg ttc ctc ttt gtg gtg gca gca gct aca ggt	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gtc cag tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag	96
Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aaa cct tct gga ggc atc ttc	144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Gly Ile Phe	
35 40 45	
agc acc tat gct atc agc tgg gtg cga cag gcc ccg gga caa ggg ctt	192
Ser Thr Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg atg gga ggg atc atc cct atg ttt ggg aca gta aac tac gca	240
Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Val Asn Tyr Ala	
65 70 75 80	
cag aag ttc cag ggc aga gtc acc att agc gcg ggc aaa tcc acg agc	288
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Gly Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc gat atg gaa ctg agc aga ctg aga tct gag gac acg gcc gtg	336
Thr Ala Asp Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gcg agg ccg cct tcc ggg ggt tgt ggt ggt gac tgc tca	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Pro Ser Gly Gly Cys Gly Gly Asp Cys Ser	
115 120 125	
cgg agg ggc tat tat tat ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg	432
Arg Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr	
130 135 140	
gtc atc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg	480
Val Ile Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu	
145 150 155 160	
gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc	528
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys	
165 170 175	
ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca	576
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser	
180 185 190	
ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc	624
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser	
195 200 205	
tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc	672
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser	

ES 2 740 051 T3

210	215	220	
ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn 225 230 235 240			720
acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His 245 250 255			768
aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val 260 265 270			816
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr 275 280 285			864
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu 290 295 300			912
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys 305 310 315 320			960
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser 325 330 335			1008
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys 340 345 350			1056
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile 355 360 365			1104
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro 370 375 380			1152
cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu 385 390 395 400			1200
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn 405 410 415			1248
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser 420 425 430			1296
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg 435 440 445			1344
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu 450 455 460			1392
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 465 470 475			1440

<210> 6

<211> 479

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 740 051 T3

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

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

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Gly Ile Phe
 35 40 45

Ser Thr Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Asp Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Pro Ser Gly Gly Cys Gly Gly Asp Cys Ser
 115 120 125

Arg Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 130 135 140

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 165 170 175

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 180 185 190

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 195 200 205

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 210 215 220

ES 2 740 051 T3

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
225 230 235 240

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
245 250 255

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
260 265 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
275 280 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
290 295 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305 310 315 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
325 330 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
340 345 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
355 360 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
370 375 380

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385 390 395 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
405 410 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
435 440 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 7

<211> 708

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

ES 2 740 051 T3

<222> (1)..(708)

<220>

<221> sig_péptido

<222> (1)..(57)

5 <220>

<221> Región_V

<222> (58)..(388)

<220>

<221> Región_C

10 <222> (389)..(705)

<400> 7

atg gcc tgg gct ctg cta ttc ctc acc ctc ctc act cag gcc aca ggg	48
Met Ala Trp Ala Leu Leu Phe Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly	
1 5 10 15	
tcc tgg gcc cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg tct ggg tct	96
Ser Trp Ala Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser	
20 25 30	
cct gga cag tcg atc acc atc tcc tgc agt gga agc agc agt gac gtt	144
Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Val	
35 40 45	
ggg gct tat aag tat gtc tcc tgg tac caa caa cac cca gcc aaa acc	192
Gly Ala Tyr Lys Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Thr	
50 55 60	
ccc aaa ctc atg att tat gat gtc aat aat cgg ccc tca ggg gtt tct	240
Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser	
65 70 75 80	
gat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc ttt ctg acc atc	288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Phe Leu Thr Ile	
85 90 95	
tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc aac tca tat	336
Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr	
100 105 110	
aca agc agc agc act cga gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc	384
Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val	
115 120 125	
cta ggt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc cca ccc tcc	432
Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser	
130 135 140	
tct gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt	480
Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser	
145 150 155 160	
gac ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc	528
Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser	
165 170 175	

ES 2 740 051 T3

ccc gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac 576
 Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn
 180 185 190

aac aag tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg cct gag cag tgg 624
 Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp
 195 200 205

aag tcc cac aaa agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc 672
 Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr
 210 215 220

gtg gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tag 708
 Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 8

<211> 235

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ala Trp Ala Leu Leu Phe Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Ser Trp Ala Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser
 20 25 30

Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Val
 35 40 45

Gly Ala Tyr Lys Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Thr
 50 55 60

Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser
 65 70 75 80

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

Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr
 100 105 110

Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 115 120 125

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

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

ES 2 740 051 T3

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

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

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

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

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 9

<211> 1581

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1581)

<220>

10 <221> sig_péptido

<222> (1)..(57)

<220>

<221> Región_V

<222> (58)..(448)

15 <220>

<221> Región_C

<222> (449)..(1578)

<400> 9

ES 2 740 051 T3

atg gac aca ctt tgc tac aca ctc ctg ctg ctg acc acc cct tcc tgg	48
Met Asp Thr Leu Cys Tyr Thr Leu Leu Leu Leu Thr Thr Pro Ser Trp	
1 5 10 15	
gtc ttg tcc cag gtc acc ttg aag gag tct ggt cct gtg ctg gtg aaa	96
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys	
20 25 30	
ccc aca gag acc ctc acg ctg acc tgc acc gtc tct ggg ttc tca ctc	144
Pro Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu	
35 40 45	
aac aat gct aga atg ggt gtg agc tgg atc cgt cag ccc cca ggg aag	192
Asn Asn Ala Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys	
50 55 60	
gcc ctg gag tgg ctt gca cac att ttt tcg aat gac gaa aaa tcc tac	240
Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr	
65 70 75 80	
agc aca tct ctg aag agc agg ctc acc atc tcc aag gac acc tcc aaa	288
Ser Thr Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys	

ES 2 740 051 T3

85					90					95						
agc	cag	gtg	ttc	ctt	acc	atg	acc	aac	atg	gac	cct	gtg	gac	aca	gcc	336
Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	
			100					105					110			
aca	tat	tac	tgt	gca	cgg	acc	cct	att	act	atg	gtt	cgg	gga	gct	att	384
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Thr	Pro	Ile	Thr	Met	Val	Arg	Gly	Ala	Ile	
			115				120					125				
agg	cta	tac	tac	tac	tac	tac	atg	gac	gtc	tgg	ggc	aaa	ggg	acc	acg	432
Arg	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	
	130					135					140					
gtc	acc	gtc	tcc	tca	gct	tcc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	480
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	
	145				150					155					160	
gcg	ccc	tgc	tcc	agg	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	528
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
				165					170					175		
ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	576
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
			180					185					190			
ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	624
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
		195					200					205				
tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	672
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
	210					215					220					
ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	acc	tgc	aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	720
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
	225				230					235					240	
acc	aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag	ctc	aaa	acc	cca	ctt	ggt	gac	aca	768
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	
				245				250						255		
act	cac	aca	tgc	cca	cgg	tgc	cca	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aca	cct	816
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	
			260					265					270			
ccc	ccg	tgc	cca	cgg	tgc	cca	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aca	cct	ccc	864
Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	
		275					280					285				
cca	tgc	cca	cgg	tgc	cca	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aca	cct	ccc	cca	912
Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	
	290					295					300					
tgc	cca	cgg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	gga	gga	ccg	tca	gtc	ttc	960
Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
	305				310					315					320	
ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gat	acc	ctt	atg	att	tcc	cgg	acc	cct	1008
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				325					330					335		
gag	gtc	acg	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	ccc	gag	gtc	1056
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
			340				345						350			

ES 2 740 051 T3

cag ttc aag tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca 1104
 Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 355 360 365

aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt gtg gtc agc gtc 1152
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 370 375 380

ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc 1200
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 385 390 395 400

aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc 1248
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 405 410 415

aaa acc aaa gga cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca 1296
 Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 420 425 430

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc 1344
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 435 440 445

aaa gcc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc agc ggg 1392
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly
 450 455 460

cag ccg gag aac aac tac aac acc acg cct ccc atg ctg gac tcc gac 1440
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 465 470 475 480

ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1488
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 485 490 495

cag cag ggg aac atc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1536
 Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 500 505 510

aac cgc ttc acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1581
 Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 515 520 525

<210> 10

<211> 526

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Asp Thr Leu Cys Tyr Thr Leu Leu Leu Thr Thr Pro Ser Trp
 1 5 10 15

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

Pro Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

ES 2 740 051 T3

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

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr
65 70 75 80

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

Ser Gln Val Phe Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Pro Ile Thr Met Val Arg Gly Ala Ile
115 120 125

Arg Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr
130 135 140

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
165 170 175

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
180 185 190

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
195 200 205

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
210 215 220

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
225 230 235 240

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr
245 250 255

Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro
260 265 270

Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro
275 280 285

Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro
290 295 300

Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

ES 2 740 051 T3

<222> (1)..(66)

<220>

<221> Región_V

<222> (67)..(391)

5 <220>

<221> Región_C

<222> (392)..(711)

<400> 11

atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg cta ctc tgg	48
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp	
1 5 10 15	
ctc cga ggt gcc aga tgt gac atc cag gtg acc cag tct ccg tcc tcc	96
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser	
20 25 30	
ctg tct gcg tct gta gga gac aga gtc acc atc aat tgc cgg gca agt	144
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser	
35 40 45	
cag agc att ggc acc tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa	192
Gln Ser Ile Gly Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	
50 55 60	
gcc cct aac ctc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg cag agt ggg gtc	240
Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val	
65 70 75 80	
cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc	288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
85 90 95	
atc agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag	336
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	
100 105 110	
act tac agt acc ccc acg tgg acg ttc ggc cga ggg acc aag gtg gaa	384
Thr Tyr Ser Thr Pro Thr Trp Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu	
115 120 125	
atc aag cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct	432
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser	
130 135 140	
gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat	480
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn	
145 150 155 160	
aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc	528
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala	
165 170 175	
ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag	576
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys	
180 185 190	
gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac	624
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp	
195 200 205	

ES 2 740 051 T3

tac gag aaa cac aaa ctc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg 672
 Tyr Glu Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 210 215 220

agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 714
 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 12

<211> 237

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Thr Tyr Ser Thr Pro Thr Trp Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu
 115 120 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 130 135 140

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

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp

ES 2 740 051 T3

195

200

205

Tyr Glu Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 210 215 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 13

<211> 31

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador directo de PCR

<400> 13

gactgaattc tttttttt tttttttt v 31

10 <210> 14

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> PCR reverse primer

<400> 14

actggaattc ggtgctttat ttccatgctg g 31

<210> 15

<211> 30

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> PCR reverse primer

<400> 15

25 actggaattc gtacgtgcca agcatcctcg 30

<210> 16

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> PCR reverse primer

<400> 16

actggaattc agaggcaaaa ggatgggagg 30

<210> 17
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> PCR reverse primer
 <400> 17
 gactgaattc ctggaactga ggagcaggtg g 31
 <210> 18
 10 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> PCR reverse primer
 15 <400> 18
 gactgaattc cctgggatcc tgcagctc 28
 <210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> PCR reverse primer
 <400> 19
 actggaattc ggggtgaggg ttgagaacc 29
 25 <210> 20
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador directo de PCR
 <400> 20
 atcgtctaga gccacatgg actggacctg gaggttcc 38
 <210> 21
 <211> 38
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

<223> Cebador directo de PCR
 <400> 21
 atcgtctaga gccacatgg actggacctg gaggttcc 38
 <210> 22
 5 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de PCR
 10 <400> 22
 atcgtctaga gccacatgg acacacttg ctacacactc c 41
 <210> 23
 <211> 32
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> PCR reverse primer
 <400> 23
 tgacgaattc cactcattta cccggagaca gg 32
 20 <210> 24
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador directo de PCR
 <400> 24
 atcgtctaga gccacatgg cctgggctct gctattc 37
 <210> 25
 <211> 34
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> PCR reverse primer
 <400> 25
 35 actggaattc gaacctatga acattctgta gggg 34
 <210> 26
 <211> 35

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de PCR
 5 <400> 26
 atcgtctaga gccacatgg acatgagggt ccccg 35
 <210> 27
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> PCR reverse primer
 <400> 27
 gactgaattc ctaacactct cccctgtga agc 33
 15 <210> 28
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Cebador directo de PCR
 <400> 28
 atcgtctaga gtcagctagc accaagggcc catcgttcc cc 42
 <210> 29
 <211> 32
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> PCR reverse primer
 <400> 29
 30 tgacgaattc cactcattta cccggagaca gg 32
 <210> 30
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador directo de PCR
 <400> 30

ES 2 740 051 T3

```

atcgtctaga gccacatgg actggacctg gaggttcc      38
<210> 31
<211> 29
<212> ADN
5  <213> Artificial
   <220>
   <223> PCR reverse primer
   <400> 31
gatgctagct gaggagacgg tgatcgtgg      29
10 <210> 32
    <211> 1461
    <212> ADN
    <213> Artificial
    <220>
15 <223> Inserto HC de RhD1 para vector de expresión pCB3
    <400> 32
tctagagcca ccatggactg gacctggagg ttcctctttg tggtaggcagc agctacaggt      60
gtccagtccc aggtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg      120
gtgaaggctct cctgcaaggc ttctggaggc atcttcagaa cctatgctat cagctgggtg      180
cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg atgggagga tcatccctat gtttgggtaca      240
gtaaactacg cacagaagtt ccagggcaga gtcacgatta gcgaggacaa atccacgagc      300
acagcctata tggaaactgag cagactgaga tctgaggaca cggccgtgta ttactgtgcg      360

```

ES 2 740 051 T3

aggccgcctt ccgggggttg tgggtggtgac tgetcacgga ggggctaacta ctacgccatg 420
gacgtctggg gccaaaggac cacgatcacc gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg 480
gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 540
ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc 600
agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag gactctactc cctcagcagc 660
gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 720
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagcca aatcttgtga caaaactcac 780
acatgccac cgtgccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 840
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 900
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 960
cataatgcca agacaaagcc ggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1020
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1080
aaciaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1140
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1200
ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1260
gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1320
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1380
tgetccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1440
ccgggtaaat gagtggaatt c 1461

<210> 33

<211> 730

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Inserto LC de RhD1 para vector de expresión pCB11

<400> 33

tctagagcca ccatggcctg ggctctgcta ttctcacc tctcactca gggcacaggg 60
tcctgggccc agtctgcct gactcaacct gcctccgtgt ctgggtctcc tggacagtcg 120
atcaccatct cctgcagtgg aagcagcagt gacgttgggtg gttataagta tgtctcctgg 180
taccaacaac acccaggcaa agcccccaa ctcatgattt atgatgtcaa taatcgcccc 240
tcaggggttt ctaatcgctt ctctggctcc aagtctggca acacggcctc cctgaccatc 300
tctgggctcc aggctgagga cgaggctgat tattactgca gctcatatac aagcagcagc 360
actcgagtgt tcggcggagg gacgaagctg accgtcctag gtcagcccaa ggctgcccc 420
tcggtcactc tgttcccacc ctctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cacactgggtg 480
tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtg cctggaaggc agatagcagc 540

ES 2 740 051 T3

cccgtcaagg cgggagtgga gaccaccaca ccctccaaac aaagcaacaa caagtacgcg 600
 gccagcagct acctgagcct gacgcctgag cagtggaggt cccacaaaag ctacagctgc 660
 caggtcacgc atgaagggag caccgtggag aagacagtgg cccctacaga atgttcatag 720
 gttcgaattc 730
 <210> 34
 <211> 1461
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inserto HC de RhD2 para vector de expresión pCB3
 <400> 34
 tctagagcca ccatggactg gacctggagg ttctctttg tgggtggcagc agctacaggt 60
 gtccagtcct aggtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg 120
 gtgaaggtct cctgcaaacc ttctggaggc atcttcagca cctatgctat cagctgggtg 180
 cgacaggccc cgggacaagg gcttgagtgg atgggaggga tcatccctat gtttgggaca 240
 gtaaaactacg cacagaagtt ccagggcaga gtcaccatta gcgcgggcaa atccacgagc 300
 acagccgata tggaaactgag cagactgaga tctgaggaca cggccgtgta ttactgtgcg 360
 aggccgcctt ccgggggttg tgggtggtgac tgctcacgga ggggctatta ttatggtatg 420
 gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacg gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg 480
 gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 540
 ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 600
 agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 660
 gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 720
 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 780
 acatgcccac cgtgccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 840
 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg 900
 gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 960
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1020
 gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1080
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1140
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1200
 ctgacctgcc tgggtcaaag cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1260
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1320
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1380
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1440
 10 ccgggtaaat gagtggaatt c 1461

ES 2 740 051 T3

<210> 35

<211> 730

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Inserto LC de Rhd2 para vector de expresión pCB11

<400> 35

```
tctagagcca ccatggcctg ggctctgcta ttctcacc cctcactca gggcacaggg      60
tcctgggccc agtctgccct gactcagcct gcctccgtgt ctgggtctcc tggacagtcg    120
atcaccatct cctgcagtgg aagcagcagt gacgttggtg cttataagta tgtctcctgg    180
taccaacaac acccaggcaa aacccccaaa ctcatgattt atgatgtcaa taatcggcc     240
tcaggggttt ctgatcgctt ctctggctcc aagtctggca acacggcctt tctgaccatc    300
tctgggctcc aggctgagga cgaggctgat tattactgca actcatatac aagcagcagc    360
actcgagtgt tcggcgggag gaccaagctg accgtcctag gtcagcccaa ggctgcccc     420
tcggtcactc tgttcccacc ctctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cacactgggtg    480
tgttcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cctggaaggc agatagcagc    540
cccgtcaagg cgggagtgga gaccaccaca ccctccaaac aaagcaaca caagtacgcg     600
gccagcagct acctgagcct gacgcctgag cagtggaagt cccacaaaag ctacagctgc    660
caggtcacgc atgaagggag caccgtggag aagacagtgg cccctacaga atgttcatag    720
gttcgaattc                                     730
```

<210> 36

10 <211> 1602

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Inserto HC de Rhd2 HC para vector de expresión pCB3

15 <400> 36

```
tctagagcca ccatggacac actttgctac aactcctgc tgetgaccac cccttcctgg     60
gtcttgctcc aggtcacctt gaaggagtct ggtcctgtgc tgggtgaaacc cacagagacc    120
ctcacgctga cctgcaccgt ctctgggttc tactcaaca atgctagaat ggggtgtgagc    180
tggatccgtc agccccagc gaaggccctg gagtggcttg cacacatttt ttcgaatgac    240
gaaaaatcct acagcacatc tctgaagagc aggtcacca tctccaagga cacctccaaa    300
agccaggtgt tccttaccat gaccaacatg gaccctgtgg acacagccac atattactgt    360
gcacggacc cttactat gggtcgggga gctattagc tatactacta ctactacatg     420
gacgtctggg gcaaagggac cacggtcacc gtctcctcag cttccaccaa gggcccatcg    480
```

ES 2 740 051 T3

gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 540
ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 600
agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag gactctactc cctcagcagc 660
gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct acacctgcaa cgtgaatcac 720
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagctca aaacccact tggtgacaca 780
actcacacat gccacgggtg cccagagccc aaatcttgtg acacacctcc cccgtgcccc 840
cggtgcccag agcccaaadc ttgtgacaca cctccccat gccacgggtg cccagagccc 900
aaatcttgtg acacacctcc cccatgcccc cggtgcccag cacctgaact cctgggagga 960
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggataccc ttatgatttc cgggacctc 1020
gaggtcacgt gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaagtgg 1080
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagttcaac 1140
agcacgttcc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaacggcaag 1200
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccacgagaa aaccatctcc 1260
aaaaccaaag gacagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1320
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gcttctaccc cagcgacatc 1380
gccgtggagt gggagagcag cgggcagccg gagaacaact acaacaccac gcctcccatg 1440
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagetca ccgtggacaa gagcaggtgg 1500
cagcagggga acatcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg 1560
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagtggaat tc 1602

<210> 37

<211> 732

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Inserto LC de RhD3 para vector de expresión pCB11

<400> 37

tctagagcca ccatggacat gagggtcccc gctcagctcc tggggctcct gctactctgg 60
ctccgaggtg ccagatgtga catccaggtg acccagtctc cgtcctccct gtctgcgtct 120
gtaggagaca gagtcacat caattgccgg gcaagtcaga gcattggcac ctatttaaat 180
tggtatcagc agaaaccagg gaaagcccct aacctcctga tctatgctgc atccagtttg 240
cagagtgggg tcccatcaag gttcagtggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtc tgcaacctga agattttgca acttattact gtcaacagac ttacagtacc 360
cccacgtgga cgttcggccc agggaccaag gtggaaatca agcgaactgt ggctgcacca 420
tctgtettca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg 480

ES 2 740 051 T3

tgctgctga ataaacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgggaaggt ggataacgcc 540
 ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 600
 agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa actctacgcc 660
 tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag 720
 tgtttagaat tc 732

<210> 38

<211> 1602

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Inserto HC de RhD1V3C para vector de expresión pCB3

<400> 38

tctagagcca ccatggactg gacctggagg ttctctttg tgggtggcagc agctacaggt 60
 gtccagtccc aggtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg 120
 gtgaaggtct cctgcaaggc ttctggaggc atcttcagaa cctatgctat cagctgggtg 180
 cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg atgggagggga tcatccctat gtttggtaca 240
 gtaaactacg cacagaagtt ccagggcaga gtcacgatta gcgcggaaca atccacgagc 300
 acagcctata tggaaactgag cagactgaga tctgaggaca cggccgtgta ttactgtgcg 360
 aggccgcctt ccgggggttg tgggtggtgac tgctcacgga ggggctacta ctacgccatg 420
 gacgtctggg gccaaaggac cacgatcacc gtctcctcag ctacaccaa gggcccatcg 480
 gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 540
 ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 600
 agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag gactctactc cctcagcagc 660
 gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acacctgcaa cgtgaatcac 720
 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagctca aaacccact tggtgacaca 780
 actcacacat gccacgggtg cccagagccc aaatcttgtg acacacctcc cccgtgcccc 840
 cgggtgccag agcccaaact ttgtgacaca cctccccat gccacgggtg cccagagccc 900
 aaatcttgtg acacacctcc cccatgcccc cggtgcccag cacctgaact cctgggagga 960
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggataccc ttatgatttc cgggacctct 1020
 gaggtcacgt gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaagtgg 1080
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac 1140
 agcacgttcc gtgtggctcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactggct gaacggcaag 1200
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1260
 aaaaccaaag gacagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc cggggaggag 1320
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctacct cagcgacatc 1380

ES 2 740 051 T3

gccgtggagt gggagagcag cgggcagccg gagaacaact acaacaccac gcctcccatg 1440
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1500
 cagcagggga acatcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg 1560
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagtggaat tc 1602

<210> 39

<211> 1463

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación HC de RhD1 Optimizada

<400> 39

ggatccgcc a ccatggactg gacctggcgc ttcctgttcg tggaggccgc cgccaccggc 60
 gtgcagagcc aggtgcagct ggtgcagagc ggcgccgagg tgaagaagcc cggcagcagc 120
 gtcaaggtgt cctgcaaggc cagcggcggc atcttccgca cctacgccat ctcttgggtc 180
 cggcaggtc cggggcaggg gctcgagtgg atggcggca tcatcccat gttcggcacc 240
 gtgaactacg cccagaagtt ccagggccgc gtcaccatca gcgccgacaa gagcaccagc 300
 accgcctaca tggagctgtc ccgcctgcgc tccgaggaca ccgccgtgta ctactgtgct 360
 aggcctccca gcggcggctg cggcggcgac tgcagccgca ggggctacta ctacgctatg 420
 gacgtgtggg gccagggcac caccatcacc gtgagcagcg ctagcaccaa gggccccagc 480
 gtgttcccc tggccccag cagcaagagc acctccggcg gcaccgccgc cctgggctgc 540
 ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg accgtgagct ggaacagcgg cgccctgacc 600
 agcggcgtgc acaccttccc cgccgtgctg cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc 660
 gtggtgaccg tgcccagcag cagcctgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac 720
 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag gtggagccca agagctgcga caagaccac 780
 acctgcccc cctgccccgc ccccgagctg ctggcgggcc cctccgtgtt cctgttcccc 840
 cccaagccca aggacaccct gatgatcagc cgcacccccg aggtgacctg cgtggtggtg 900
 gacgtgagcc acgaggacc cagaggtgaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 960
 cacaacgcc a agaccaagcc ccgcgaggag cagtacaaca gcacctaccg cgtggtgtcc 1020
 gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1080
 aacaaggccc tgccccccc catcgagaag accatcagca aggccaaggg gcagcctaga 1140
 gagccccagg tctacaccct gcctccatcc cgcgacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc 1200
 ctgacctgtc tggtaagggt cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac 1260
 ggccagcccc agaacaacta caagaccacc cccccctgc tggacagcga cggcagcttc 1320
 ttcctgtaca gcaagctgac cgtggacaag agccctggc agcagggcaa cgtgttcagc 1380
 tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacacc agaagagcct gagcctgtcc 1440
 10 cccggcaagt gatgagcggc cgc 1463

ES 2 740 051 T3

<210> 40

<211> 731

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia de codificación LC de RhD1 optimizado

<400> 40

```

ggatccgccca ccatggcctg ggccctgctg ttctgaccc tgctgaccca gggcaccggc      60
agctgggccc agagcgccct gaccagccc gccagcgtga gcggcagccc cggccagtct      120
atcaccatct cttgtagcgg cagcagcagc gacgtgggcg gctacaagta cgtgtcttgg      180
tatcagcagc accccggcaa ggccccccag ctgatgatct acgacgtgaa caaccgcccc      240
agcggcgtga gcaaccgctt cagcggctcc aagagcggca acaccgccag cctgaccatc      300
tctgggctgc aggctgagga cgaggccgac tactactgca gcagctacac cagcagctcc      360
acccgcgtgt tcggcggcgg caccaagctg accgtgctgg gccagcccaa ggccgcccc      420
agcgtgaccc tgttcccccc cagcagcagc gagctccagg ccaacaaggc taccctggtg      480
tgcctgatca gcgacttcta ccccggcgcc gtgaccgtcg cctggaaggc cgacagcagc      540
cccgtgaagg ccggcgtgga gaccaccacc cccagcaagc agagcaacaa caagtacgcc      600
gccagcagct acctgagcct gacccccgag cagtggaaga gccacaagag ctacagctgc      660
caggtgaccc acgagggcag caccgtggag aagaccgtgg cccccaccga gtgcagctga      720
tgagcggccg c

```

<210> 41

10 <211> 1604

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación HC de RhD3 optimizado

15 <400> 41

```

ggatccgccca ccatggacac cctgtgctac accctgctgc tgctgaccac ccccagctgg      60
gtgctgtccc aggtgaccct gaaggagagc ggccctgtcc tggggaagcc caccgagacc      120
ctgaccctga cctgcaccgt gagcggcttc agcctgaaca acgcccgcac gggcgtgagc      180
tggatcaggc agccccctgg caaggccctg gagtggctgg cccacatctt cagcaacgac      240
gagaagagct acagcaccag cctgaagagc cgcctgacca tcagcaagga caccagcaag      300
agccaggtgt tcctgacat gaccaacatg gaccccgctg acaccgccac ctactactgc      360
gccccacccc ccatcacaat ggtcagaggc gccatccgcc tgtactacta ctattacatg      420
gacgtgtggg gcaagggcac caccgtgacc gtgagcagcg ctagacacaa gggccccagc      480

```

ES 2 740 051 T3

gtgttcccc tggccccctg cagccgcagc acctctggcg gcaccgccgc tctgggctgc 540
ctggtgaagg actacttccc cgagcctgtg accgtgtcct ggaactctgg cgccctgacc 600
agcggcgtgc acaccttccc cgccgtgctg cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc 660
gtggtgaccg tgcccagcag cagcctgggc acccagacct acacctgcaa cgtgaaccac 720
aagcccagca acaccaaggt ggacaagcgc gtggagctga agacccccct gggcgacacc 780
accacacct gccccagatg tcccagagccc aagagctgcg acaccccccc tccctgccct 840
cgctgccctg agcctaagtc ctgtgacacc cctccccctt gccccgggtg tccagagcca 900
aagtcttgcg ataccccacc cccctgtcca aggtgccctg cccccgagct gctgggaggga 960
ccctccgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccgcaccccc 1020
gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgagc cagcaggacc ccgaggtgca gttcaagtgg 1080
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc cccgcgagga gcagttaac 1140
agcaccttcc gcgtgggtgtc tgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 1200
gaatacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgagaa gaccatctct 1260
aagaccaagg gccagcctcg cgagccccag gtgtacaccc tgccccccag ccgcgaggag 1320
atgaccaaga accaggtgtc cctcacctgc ctctggaagg gcttctaccc cagcgacatc 1380
gccgtggagt gggagtccag cggccagccc gagaacaact acaacaccac cccccccatg 1440
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagetga ccgtggacaa gagccgctgg 1500
cagcagggca acatcttctc ttgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccgcttcacc 1560
cagaagagcc tgagcctgtc ccccggcaag taatgagcgg ccgc 1604

<210> 42

<211> 737

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación LC de RhD3 optimizado

<400> 42

ggatccgcc ccatggacat gcgcgtgccc gccagctgc tgggcctgct gctgctgtgg 60
ctgagggggcg cccgctgcga catccagggtg acccagagcc ccagcagcct gagcgcacgc 120
gtgggcgacc gcgtgaccat caactgccgc gccagccaga gcatcggcac ctacctgaac 180
tggtatcagc agaagcccgg caaggccccc aacctgctga tctacgccgc cagctccctg 240
cagagcggcg tgcccagccg cttcagcggc agcggctccg gcaccgactt caccctgacc 300
atcagcagcc tgcagcccga ggacttcgcc acctactact gccagcagac ctacagcacc 360
cccacctgga ccttcggcag gggcaccaag gtggagatca agcgcaccgt ggccgcccc 420
agcgtgttca tcttcccccc cagcgcagcag cagctgaaga gcggcaccgc tagcgtgggtg 480

ES 2 740 051 T3

tgctgctga acaacttcta cccccgcgag gccaaagtgc agtggaggt ggacaacgcc 540
 ctgcagtccg gcaacagcca ggagagcgtc accgagcagg acagcaagga ctccacctac 600
 agcctgagca gcaccctgac cctgagcaag gccgactacg agaagcaca gctgtacgcc 660
 tgcgaggtga cccaccaggg cctgtccagc cccgtgacca agagcttcaa ccgcggcgag 720
 tgctgatgag cggccgc 737
 <210> 43
 <211> 30
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de PCR
 <400> 43
 atcgtctaga gccacatgg actggacctg 30
 10 <210> 44
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> PCR reverse primer
 <400> 44
 atcgggatcc tcatcactg ccgggggac 29
 <210> 45
 <211> 29
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de PCR
 <400> 45
 25 atcgtctaga gccacatgg cctgggccc 29
 <210> 46
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> PCR reverse primer
 <400> 46
 atcgggatcc tcatcagctg cactcgggtg gg 32

ES 2 740 051 T3

<210> 47

<211> 1461

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Inserto HC de RhD1 optimizado para vector pCB3

<400> 47

```
tctagagcca ccatggactg gacctggcgc ttcctgttcg tggaggccgc cgccaccggc 60
gtgcagagcc aggtgcagct ggtgcagagc ggcgccgagg tgaagaagcc cggcagcagc 120
gtcaagggtgt cctgcaaggc cagcggcggc atcttccgca cctaccgcat ctcttgggtc 180
cggcaggctc ccgggcaggg gctcagtggt atggcggca tcatcccat gttcggcacc 240
gtgaactacg cccagaagtt ccagggccgc gtcaccatca gcgccgaaa gagcaccagc 300
accgcctaca tggagctgtc ccgcctgcgc tccgaggaca ccgccgtgta ctactgtgct 360
aggcctccca gcggcggctg cggcggcgac tgcagccgca ggggctacta ctacgctatg 420
gacgtgtggg gccaggcac caccatcacc gtgagcagcg ctagcaccaa gggccccagc 480
gtgttcccc tggccccag cagcaagagc acctccggcg gcaccgccgc cctgggctgc 540
ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg accgtgagct ggaacagcgg cgccctgacc 600
agcggcgtgc acaccttccc cgccgtgctg cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc 660
gtggtgaccg tgcccagcag cagcctgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac 720
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag gtggagccca agagctgcga caagaccac 780
acctgcccc cctgccccgc ccccgagctg ctggcgggcc cctccgtgtt cctgttcccc 840
cccaagccca aggacaccct gatgatcagc cgacccccg aggtgacctg cgtggtggtg 900
gacgtgagcc acgaggacct cgaggtgaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 960
cacaacgcca agaccaagcc ccgcgaggag cagtacaaca gcacctaccg cgtggtgtcc 1020
gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1080
aacaaggccc tgcccccccc catcgagaag accatcagca aggccaaggg gcagcctaga 1140
gagccccagg tctacacctt gcctccatcc cgcgacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc 1200
ctgacctgtc tggtaagggt cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac 1260
ggccagcccc agaacaacta caagaccacc cccccgtgc tggacagcga cggcagcttc 1320
ttcctgtaca gcaagctgac cgtggacaag agccgctggc agcagggcaa cgtgttcagc 1380
tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacacc agaagagcct gagcctgtcc 1440
cccggaagt gatgaggatc c 1461
```

<210> 48

10 <211> 729

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 740 051 T3

<220>

<223> Inserto LC de RhD1 optimizado para vector pCB11

<400> 48

```
tctagagcca ccatggcctg ggccctgctg ttctgaccc tgctgacca gggcaccggc      60
agctgggccc agagcgcctt gaccagccc gccagcgtga gggcagccc cggccagtct      120
atcaccatct cttgtagcgg cagcagcagc gacgtgggcg gctacaagta cgtgtcttgg      180
tatcagcagc acccggcaa ggccccccag ctgatgatct acgacgtgaa caaccgcccc      240
agcggcgtga gcaaccgctt cagcggctcc aagagcggca acaccgccag cctgaccatc      300
tctgggctgc aggctgagga cgaggccgac tactactgca gcagctacac cagcagctcc      360
accgcgctgt tcggcggcgg caccaagctg accgtgctgg gccagcccaa ggccgcccc      420
agcgtgaccc tgttcccccc cagcagcagc gagctccagg ccaacaaggc taccctggtg      480
tgcctgatca gcgacttcta ccccgcgccc gtgaccgtcg cctggaaggc cgacagcagc      540
cccgtgaagg ccggcgtgga gaccaccacc cccagcaagc agagcaacaa caagtacgcc      600
gccagcagct acctgagcct gacccccgag cagtggaaga gccacaagag ctacagctgc      660
caggtgaccc acgagggcag caccgtggag aagaccgtgg ccccaccga gtgcagctga      720
tgaggatcc                                     729
```

5

REIVINDICACIONES

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

Figura 2

```

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

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

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

LC de RhD1  PVKAG-VETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG--STVEKTVAPTE 233
LC de RhD2  PVKAG-VETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG--STVEKTVAPTE 233
LC de RhD3  LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE 236
      ... * : * . . . . . * : * * * : : : . * * * : * * * : * * * * * * * * * * *

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

Figura 3

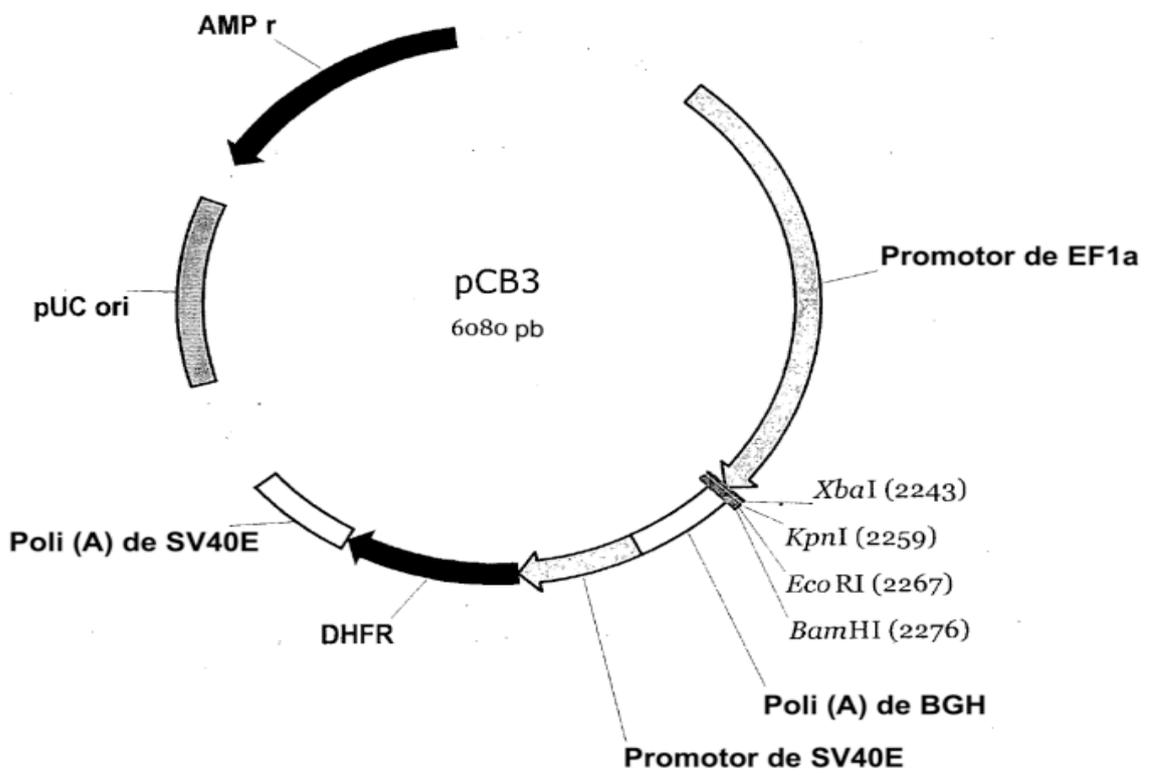


Figura 4

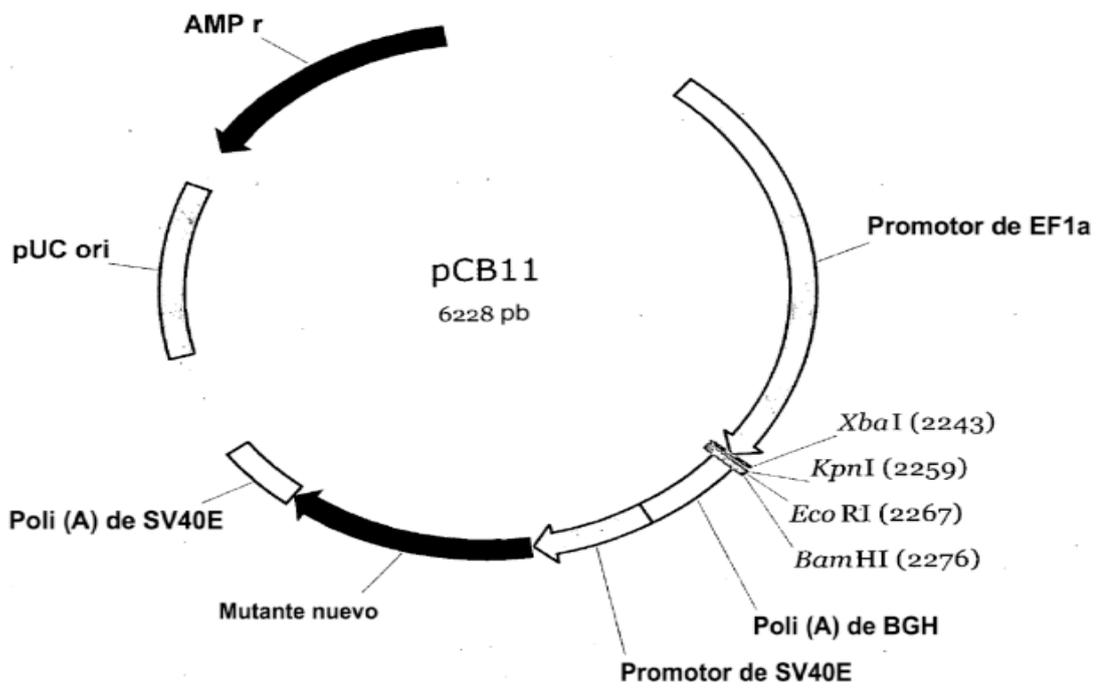


Figura 5

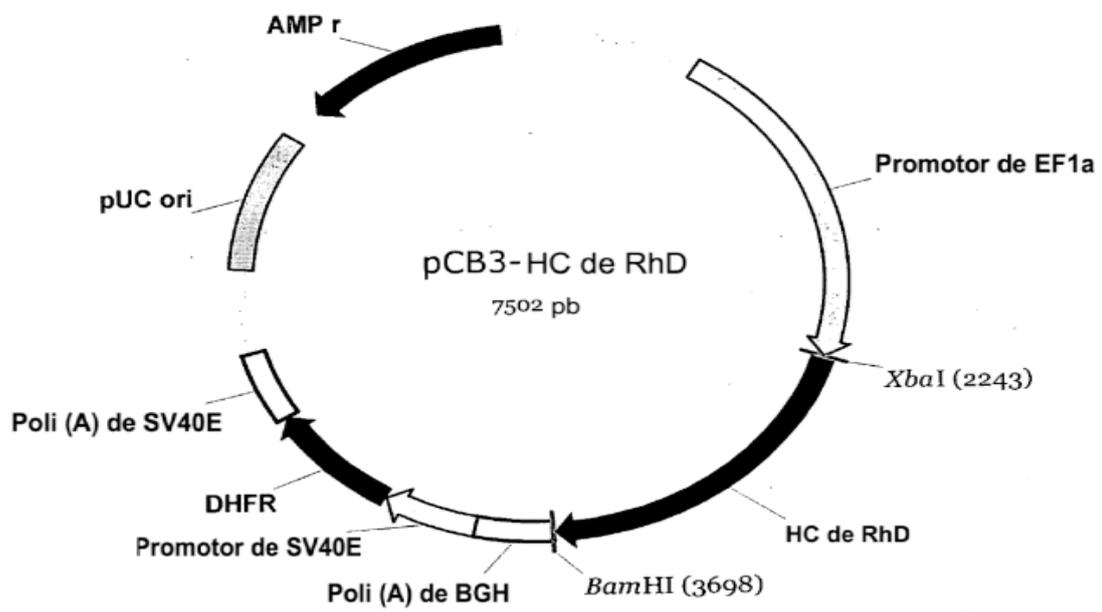


Figura 6.

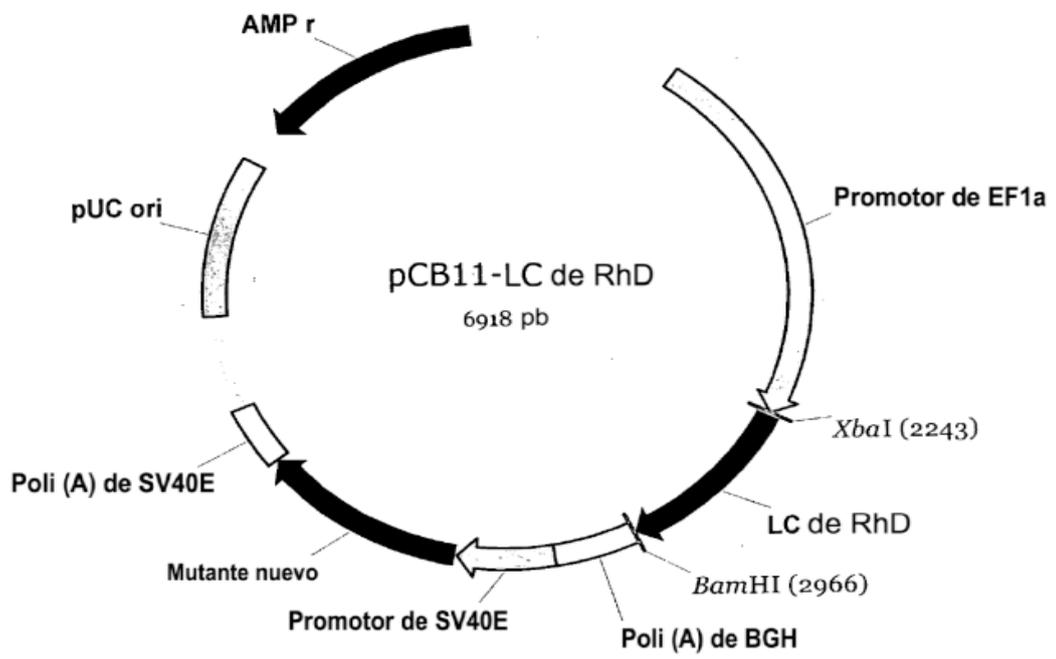


Figura 7

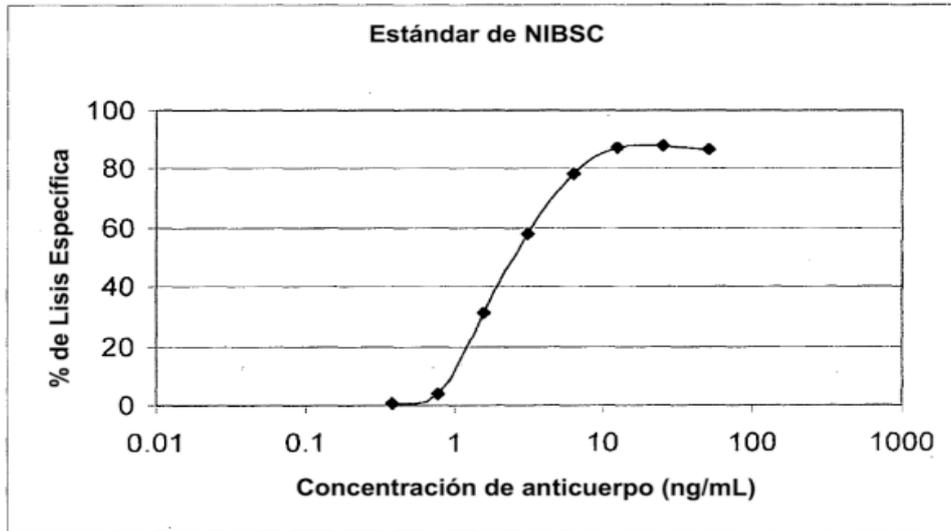


Figura 8

