



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 618**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98965434 .8**

96 Fecha de presentación : **22.12.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1042492**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2000**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanizados que protegen contra la enfermedad inducida por la toxina Shiga.**

30 Prioridad: **23.12.1997 US 68635 P**
18.12.1998 US 215163

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2010

73 Titular/es: **SUNOL MOLECULAR CORPORATION**
2810 North Commerce Parkway
Miramar, Florida 33025, US
HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE
ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE

72 Inventor/es: **Stinson, Jeffrey R.;**
Wong, Hing;
O'Brien, Alison D.;
Schmitt, Clare K. y
Melton-Celsa, Angela

74 Agente: **Díaz de Bustamante Terminel, Isidro**

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 humanizados que protegen contra la enfermedad inducida por la toxina shiga.

5 **Campo de la invención**

Los solicitantes describen una familia de proteínas bacterianas de unidades múltiples que se asocian con la colitis hemorrágica y la secuela que amenaza la vida, síndrome urémico hemolítico. Estas proteínas, definidas como miembros de la “familia de toxina Shiga”, se han utilizado en el aislamiento e identificación de anticuerpos monoclonales de murino. Los solicitantes describen además, la construcción de anticuerpos monoclonales humanizados que incorporan las regiones variables de ratón. Los solicitantes también describen anticuerpos para toxinas Shiga o toxoides, tanto monoclonales como policlonales, y su uso en el tratamiento, diagnóstico, y prevención de la enfermedad y de las infecciones provocadas por *E. coli* patogénico. Se describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanizados para proteínas de la familia de toxina Shiga.

15 **Antecedentes de la invención**

Se asocian *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en inglés) con brotes transmitidos por alimentos con diarrea con sangre o “colitis hemorrágica” (HC, por sus siglas en inglés) y el síndrome urémico hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés). (Spika, J. y col., *J. Pediatr.*, 109:287-297 (1986); Remis, R. *Ann. Intern. Med.*, 101:624-626 (1984); Riley, L. y col., *N. Engl. J. Med.*, 308:681-685 (1983)). La infección EHEC puede ser mortal y posee una amenaza importante para los jóvenes y los ancianos, quienes son los que más probabilidad tienen de desarrollar serias complicaciones de infecciones EHEC. Diversos brotes y casos esporádicos de HC y HUS han ocurrido durante los últimos años, con el brote más grande de E.U.A. en 1993. En tal brote, más de 500 casos de HC y HUS se localizaron en hamburguesas contaminadas de una caja sorpresa de un restaurante de comida rápida. (Centers for Disease Control and Prevention, *Morbid. Mortal Weekly Rep.*, 42:258 (1993)). En julio de 1996, un brote más grande de EHEC en Japón resultó en más de 10,000 individuos infectados y 8 muertes. Muchos niños japoneses requirieron hospitalización.

Primordialmente, HC y HUS se transmiten por la ingestión de comida contaminada, particularmente productos de carne de vacuno no totalmente cocinada, tal como hamburguesas. (Doyle y col., *J. Appl. Environ. Microbiol.* 53:2394 (1987); Samadpour y col., *J. App. Environ. Microbiol.* 60: 1038 (1994)). Con la prevalencia de EHEC en ganado y la naturaleza subjetiva de diferenciar entre hamburguesas parcial y totalmente cocinadas, una parada en un restaurante de comida rápida o una parrillada familiar puede resultar en tragedia.

HC y HUS parecen estar mediados por la toxina producida por EHEC y *Shigella dysenteriae* (para una revisión, ver, O'Brien and Holmes, *Microbiol. Rev.*, 51:206-220 (1987)). Estas bacterias producen una familia de citotoxinas estrechamente relacionadas que colectivamente se llamarán “toxinas Shiga” para el propósito de esta solicitud. Las toxinas Shiga (alternativamente, “verotoxinas”) tienen actividad citotóxica, y enterotóxica (Strockbine, N. y col., *Infect. Immun.*, 53: 135-140 (1986)).

Con base en la exhibición de la reactividad no cruzada inmunológica, las toxinas Shiga se han dividido en dos grupos. (Strockbine y col., *supra*). Estos grupos se han designado toxina Shiga tipo 1 (Stx1, por sus siglas en inglés) y toxina Shiga tipo 2 (Stx2, por sus siglas en inglés). El grupo Stx1 contiene la toxina Stx1 de prototipo de EHEC así como la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1. En años recientes, otros tipos de toxinas se han descubierto y considerado ser miembros del grupo Stx2. Estas son Stx2e, Stx2c, y Stx2d. (Lindgren y col., *Infection and Immunology*, 61:3832 (1993); Schmitt, C. y col., *Infect. Immun.*, 59: 1065-1073 (1991); Marques, L. y col., *FEMS Lett.*, 44: 33-38 (1987)).

Para los propósitos de esta solicitud el término “toxina Shiga” abarca toxina Shiga y cualquiera de las demás toxinas en el grupo Stx1 o Stx2 o sus variantes. La abreviatura “Stx” se referirá a la proteína de toxina por sí misma.

A pesar de este conocimiento sobre los resultados de la exposición a estas toxinas, actualmente no existe cura o vacuna conocida para HC o HUS. Los antibióticos incluso hacer que las complicaciones severas empeoren al incrementar la toxina liberada de las bacterias. De esta manera, existe una necesidad de un compuesto para prevenir o tratar las complicaciones de EHEC producidas por la toxina Shiga. Tal compuesto puede usarse para tratar pacientes infectados y disminuir los efectos sistémicos de la toxina en el SNC, sangre y riñones. Además, si la toxina puede neutralizarse, los antibióticos pueden administrarse de manera segura para exterminar las bacterias en el tracto GI. Tal compuesto también puede ser utilizado para prevenir complicaciones infecciosas, al tratar individuos que están expuestos o con alto riesgo, antes de que adquieran la infección EHEC. Tales individuos deben incluir niños en guardería o ancianos en asilos para ancianos, en los que se ha detectado un caso de diarrea EHEC. Estos individuos tienen mayor riesgo de desarrollar diversas complicaciones y la propagación de EHEC en estos ambientes no es inusual.

El conocimiento de la reactividad cruzada inmunológica de las toxinas Shiga ofrece una perspectiva tentadora para enfoques farmacológicos del tratamiento de EHEC. Actualmente, no existen agentes profilácticos o terapéuticos conocidos disponibles para esta enfermedad. En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de proporcionar anticuerpos monoclonales que puedan enlazar a las toxinas Shiga que sean capaces de prevenir o disminuir los efectos devastadores de estas toxinas. También existe en la técnica una necesidad de datos acerca del sitio de

enlace de tales anticuerpos, de manera que otros anticuerpos con capacidades similares puedan ser identificados y aislados.

Los anticuerpos monoclonales contra las toxinas tipo Shiga se han descrito en Strockbine y col., *Infection and Immunity*, 1985, 50: 695-7010 y en Perera, y col., *J. Clinical Microbiol.*, 1988, 26: 2127-2131. Strockbine *et al* describe que el uso del anticuerpo 13C4 neutraliza la letalidad para ratones inducida con toxina tipo Shiga de *E. coli* H30. Strockbine y col., además muestra el uso del 13C4 para la detección de colonias bacterianas que producen altos niveles de toxinas tipo Shiga. Perera y col., describen la producción de cinco anticuerpos monoclonales de ratón (incluyendo el anticuerpo 11E10) que son capaces de neutralizar la citotoxicidad de la toxina II tipo Shiga. WO9820903, publicada el 22 de mayo de 1998 describe métodos terapéuticos para el tratamiento del síndrome urémico hemolítico, al administrar de anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales quiméricos y anticuerpos policlonales mono-específicos para toxina tipo Shiga.

Existe una necesidad relacionada en la técnica de anticuerpos monoclonales de humano/ratón humanizados y otros quiméricos. En estudios bien publicados, los pacientes a los que se han administrado anticuerpos monoclonales anti-TNF de murino (factor de necrosis del tumor) desarrollan respuestas de anticuerpo anti-murino al anticuerpo administrado. (Ver, por ejemplo, Exley A. R., y col., *Lancet* 335: 1275-1277 (1990)). Este tipo de respuesta inmune para el régimen de tratamiento, comúnmente referido como la respuesta HAMA (para anticuerpos anti-ratón humanos), disminuye la efectividad del tratamiento y puede incluso hacer que el tratamiento sea completamente ineficaz. Los anticuerpos monoclonales de humano/ratón humanizados o quiméricos han demostrado disminuir significativamente la respuesta HAMA e incrementar la efectividad terapéutica. (LoBuglio *et al.*, P.N.A.S. 86: 4220-4224 (Junio de 1989)). Los métodos para los anticuerpos humanizados comprenden el intercambio de regiones constantes (ver por ejemplo Lobuglio *et al*, *supra*) o injerto CDR (EP0239400).

25 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un primer anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a la proteína de toxina Shiga tipo 1 (Stx1) y un segundo anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a la proteína de toxina Shiga tipo 2 (Stx2), en la que el primer anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina humana y las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, como se establecen en las SEQ ID NOs: 19 y 21 y en la que el segundo anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina humana y las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, como se establecen en las SEQ ID NOs: 42 y 44.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un primer anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a Stx1 y un segundo anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza al antígeno Stx2, en la que la región variable del segundo anticuerpo comprende la región variable del anticuerpo 11E10 de murino con No. de Acceso al ATCC CRL 1907 y la región variable del primer anticuerpo comprende la región variable del anticuerpo 13C4 de murino con No. de Acceso al ATCC CKL 1794.

En modalidades particulares de las composiciones farmacéuticas descritas arriba, el primero o segundo anticuerpo comprende una región constante humana seleccionada del grupo constituido por IgG, IgA, e IgM.

En otras modalidades particulares de las composiciones farmacéuticas descritas arriba, la región constante humana del primero o segundo anticuerpo monoclonal es IgG.

Aún en otras modalidades particulares de las composiciones farmacéuticas descritas arriba, la región constante humana del primero o segundo anticuerpo monoclonal es IgG1-kappa.

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas descritas arriba, comprenden además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere además al uso de una composición que comprende de un primer anticuerpo monoclonal humanizado, que enlaza a la proteína Stx1 y un segundo anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a la proteína Stx2, en la que el primer anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina humana y las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, como se establecen en las SEQ ID NOs: 19 y 21 y en la que el segundo anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina humana y las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, como se establecen en las SEQ ID NOs: 42 y 42 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección que resulta en síndrome de uremia hemolítica provocado por *Escherichia coli* Enterohemorrágica u otras bacterias que producen la toxina Shiga.

La presente invención también se refiere al uso de una composición que comprende un primer anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a Stx1 y un segundo anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza al antígeno Stx2, en la que la región variable del segundo anticuerpo comprende la región variable del anticuerpo 11E10 de murino con el No. de Acceso al ATCC CRL 1907 y la región variable del primer anticuerpo comprende la región variable del anticuerpo 13C4 de murino con el No. de Acceso al ATCC CKL 1794 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección que resulta en síndrome de uremia hemolítica provocado por *Escherichia coli* enterohemorrágica u otras bacterias que producen la toxina Shiga.

ES 2 339 618 T3

En modalidades particulares el primero o segundo anticuerpo comprende una región constante humana seleccionada del grupo que consiste de IgG, IgA, e IgM.

En otras modalidades particulares la región constante humana del primero o segundo anticuerpo monoclonal es IgG, preferiblemente IgG1-kappa.

Para satisfacer estas necesidades en la técnica, los solicitantes proporcionan anticuerpos monoclonales de ratón humanizados para toxina 1 Shiga y toxina 2 Shiga, y además indican la región variable asociada a la neutralización de la toxina Shiga, así como las regiones que determinan la complementariedad específica (CDRs, por sus siglas en inglés) de los anticuerpos monoclonales humanos de región variable, derivados de los anticuerpos monoclonales de ratón 13C4 y 11E10, los cuales son específicamente reactivos con Stx1 y Stx2, respectivamente.

Los dibujos acompañantes se incluyen para proporcionar un mejor entendimiento de la invención. Ilustran la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Algunas de las siguientes modalidades han sido incluidas únicamente para que sirvan de referencia solamente y no caen bajo el alcance de las reivindicaciones.

La figura 1 proporciona una representación esquemática de la estrategia de clonación general que se utiliza para clonar los fragmentos del gen de región variable, tanto de los anticuerpos 11E10 como 13C4.

La figura 2 enlista las secuencias de oligonucleótidos usadas para la amplificación PCR de las regiones variables del anticuerpo 13C4.

La figura 3 menciona las secuencias de consenso de ADN y aminoácidos para las regiones variables, tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras del anticuerpo 13C4. La secuencia de consenso de ADN se determinó usando reacciones de secuencia terminadora de pigmento fluorescente automatizadas de los cADN amplificados analizados, con un instrumento procesado por secuencia ABI 373. Los CDR se identificaron de acuerdo a la nomenclatura de Kabat y Wu (Kabat, y col. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Vol. I, 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services) y se ubican como sigue:

CDRs de cadena pesada:	CDR1-aa31-35
(SEQ ID NO: 19)	CDR2-aa50-66
	CDR3-aa99-11

CDRs de cadena ligera:	CDR1-aa24-34
(SEQ ID NO: 21)	CDR2-aa50-56
	CDR3-aa89-97

La figura 4 ilustra la estrategia para la construcción del vector de expresión mamífero tKMC249A que contiene las regiones variables del anticuerpo 13C4.

La figura 5 enlista los oligonucleótidos utilizados para la amplificación PCR de las regiones variables del anticuerpo 11E10.

La figura 6 menciona las secuencias de consenso de ADN y aminoácidos para las regiones variables, tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras del anticuerpo 11E10. La secuencia de consenso de ADN se determinó usando reacciones de secuencia terminadoras de pigmento fluorescentes de los cADN amplificados, analizados con un instrumento procesado por secuencia ABI 373. Los CDR se identificaron de acuerdo con la nomenclatura de Kabat y Wu (Kabat y Wu; *supra*) y se ubican como sigue:

CDRs de cadena pesada:	CDR1-aa31-35
(SEQ ID NO: 44)	CDR2-aa50-66

ES 2 339 618 T3

CDR3-aa99-108

5 CDRs de cadena ligera: CDR1-aa24-40
(SEQ ID NO: 42) CDR2-aa56-62
CDR3-aa95-103

10

La figura 7 ilustra la estrategia para la construcción del vector de expresión mamífero pACE4 que contiene las regiones variables del anticuerpo 11E10.

15

La figura 8 muestra la producción ELISA del anticuerpo 13C4 anti-Stx1 y demuestra que la línea célula H13C4 produce un anticuerpo que consiste de dominios constantes IgG y kappa humanos.

La figura 9 muestra la actividad ELISA de enlace de toxina 13C4 anti-Stx1 y demuestra que el anticuerpo producido por la línea celular H13C4 enlaza a la toxina Stx1.

20

La figura 10 muestra la producción ELISA del anticuerpo 11E10 anti-Stx2 y demuestra que la línea celular H11E10 produce un anticuerpo que consiste de dominios constantes IgG y kappa humanos.

25

La figura 11 muestra la actividad ELISA de enlace de toxina 11E10 anti-Stx2 y demuestra que el anticuerpo producido por la línea celular H11E10 enlaza a la toxina Stx2.

La figura 12 ilustra la estrategia para la construcción del pCDNA3mut.LCPL.LCVK plásmido.

La figura 13 ilustra la estrategia para la construcción del pCDNA3mut.HCPL.HCV2B plásmido.

30

La figura 14 ilustra la estrategia para la construcción de los pSUN9 y pSUN9:kappa plásmidos.

La figura 15 ilustra la estrategia para la construcción de los pSUN10 y pSUN10:IgG1 plásmidos.

35

La figura 16 ilustra la estrategia para la construcción del pJRS311 plásmido.

La figura 17 ilustra la estrategia para la construcción del pJRS315 plásmido.

40

Descripción detallada de la invención

45

Los solicitantes describen anticuerpos monoclonales humanizados que enlazan a las proteínas de toxina Shiga, y el uso de tales anticuerpos en el tratamiento o prevención de enfermedades inducidas por toxina Shiga. Los anticuerpos son estructuras proteínicas hechas de dos cadenas pesadas y dos ligeras. Las cinco clases diferentes de anticuerpos de vertebrado superiores IgM, IgD, IgG, IgA e IgE se distinguen por sus cadenas pesadas (mu, delta, gamma, alfa y épsilon, respectivamente). Cada clase tiene subclases adicionales; IgG, por ejemplo, pueden ser IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, en las que la cadena pesada es gamma 1, gamma 2, gamma 3 o gamma 4, respectivamente. El par de cadenas ligeras en estas clases o subclases pueden ser ya sea kappa o lambda.

50

Los anticuerpos se dividen además en una región constante y una región variable. Para las cadenas pesadas así como para las ligeras, los extremos de terminal carboxi hacen la región de secuencia constante, mientras que los extremos de terminal amino contienen la región de secuencia variable. Dentro de estas regiones variables se encuentran las regiones complementarias determinantes (CDRs) que son primariamente responsables del enlace del antígeno observado, característico de los anticuerpos.

55

Anticuerpos monoclonales "humanizados" significa anticuerpos monoclonales originalmente de una fuente no humana a la que se han sustituido los componentes. En particular, los anticuerpos monoclonales humanizados comprenden regiones variables que se derivan de fuentes no humanas y regiones constantes que se derivan de fuente humanas.

60

Como se establece arriba, las proteínas de toxina Shiga (Stx) se refieren a la familia de proteínas bacterianas de unidades múltiples producidas por EHEC y *Shigella dysenteriae* que se asocian con brotes de enfermedades inducidas por toxina Shiga. Las proteínas de toxinas Shiga son supuestas abarcar Stx de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y Stx tipo 1 y tipo 2, y toxinas variantes tipo 2 de *E. coli*.

65

Las enfermedades inducidas por la toxina Shiga de los humanos incluyen diarrea con sangre, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, y púrpura trombocitopénico trombótico.

Los solicitantes describen además anticuerpos monoclonales humanizados que tienen la misma especificidad de enlace que al menos dos anticuerpos monoclonales murinos bien caracterizados. Estos dos anticuerpos monoclonales se desarrollaron en el laboratorio del Dr. Alison O'Brien como se establecen en Strockbien, N. A. y col., *Infection and Immunity*, 1985, 50: 695-700 y Perera, L. P. y col., *J. Clinical Microbiol.*, 1988, 26: 2127-2131, han sido depositados en el ATCC como se establece a continuación.

Por "misma especificidad de enlace" se entiende un nivel de enlace suficientemente detectable en un ensayo de enlace estándar para distinguir entre el enlace de toxina y el enlace de respaldo no específico, como se ejemplifica mediante los controles apropiados (por ejemplo, ver Figura 9 y Figura 11). Aquellos con experiencia ordinaria en la técnica ya pueden probar fácilmente los niveles de enlace utilizando habilidades y técnicas de rutina.

En otra modalidad preferida, los anticuerpos humanizados se caracterizan por sus características estructurales. En un aspecto de esta modalidad, la región constante es una región constante humana y la región variable se deriva de un roedor, preferiblemente un ratón. Aunque no se limite a estas, las cuatro regiones variables establecidas en la especificación, particularmente en la Figura 3 y Figura 6, son preferidas. Por supuesto, tales regiones variables pueden incluir modificaciones (esto es, eliminaciones, adiciones, y sustituciones) que no disminuyen apreciablemente el enlace característico asociado con las regiones variables ejemplificadas.

Aún en otra modalidad, se emplean los CDR de la región variable. Como se anota arriba, los CDR se ubican en las regiones variables tanto de las cadenas ligeras como de las pesadas y son responsables del enlace del antígeno. En vista de la capacidad disponible de aquellos en esta técnica para determinar las regiones CDR, la presente descripción no se limita a los CDR específicamente establecidos. Ciertamente, los vectores creados por los solicitantes y descritos en mayor detalle a continuación son suficientes para uso con cualquiera de los CDR de anticuerpos no humanos, para las toxinas Shiga.

Por ejemplo el anticuerpo monoclonal humanizado deriva sus regiones constantes de IgG1-kappa y sus regiones variables de todas o parte de las secuencias, como se establecen en las Figuras 3 y 6. Los vectores de expresión que se codifican para estos anticuerpos humanizados monoclonales, y las células hospederas que se han transformado con tales vectores de expresión, se describen en los Ejemplos. Finalmente, la invención comprende composiciones farmacéuticas, como se reivindican y describen en el "Sumario de la invención". Estas composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, diluyentes y portadores conocidos en la técnica, tales como soluciones salinas y de sacarosa apropiadas para la aplicación a pacientes. Como se usa en la presente, "pacientes" se refiere a cualquier mamífero sensible, tal como perros, caballos, ratones, etc., pero se prefiere particularmente a humanos.

Los métodos de tratamiento implican la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva, así como una cantidad profilácticamente efectiva, del anticuerpo monoclonal humanizado. Como aquellos en la técnica reconocerían que, una cantidad terapéuticamente efectiva es una dosis que alivia el edema, trombocitopenia, y uremia asociado con HUS mediado por EHEC. De manera similar, una cantidad profilácticamente efectiva es una dosis que previene a los individuos expuestos de desarrollar estos síntomas.

Los siguientes ejemplos ilustran modalidades específicas de la invención. Algunos de estos se han incluido únicamente a modo de referencia y no caen bajo el alcance de las reivindicaciones.

Humanización del anticuerpo 13C4 anti-Stx1

Los siguientes ejemplos 1-3 se refieren al anticuerpo 13C4 anti-Stx1 y su contraparte H13C4 humanizada.

Ejemplo 1

Clonación de los cADN de región variable 13C4

La célula de hibridoma que produce el anticuerpo "13C4" (anti-Stx1) se depositó el 2 de diciembre de 1987, en el American Type Culture Collection, Rockville, MD bajo el No. de Acceso CRL 1794, y puede ser obtenido del ATCC, o, como aquí, del Dr. Alison O'Brien (por ejemplo de la preparación de hibridoma, ver Strockbine, N. A. y col., *Infection and Immunity*, 50: 695-700 (1985)). Un vial de células se descongeló y se volvió a suspender en medio completo IMDM (Mediatech) complementado con FBS al 10% (Irvine).

El ARN total se aisló de 1×10^7 células "13C4" usando el kit de aislamiento de ARN Midi (Qiagen), siguiendo el procedimiento del fabricante. El ARN se disolvió en Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM (pH 8.4) que contiene 0.03 U/ μ g de inhibidor de RNasa cebado (5'-3') a una concentración final de 0.25 μ g/ μ l.

La figura 1 muestra la estrategia para clonar los fragmentos del gen de región variable y la figura 2 enlista los cebadores de oligonucleótido usados. El ARN total "13C4" (2 μ g) se convirtió a cADN al usar transcriptasa inversa superscript 11-MMLV (Life Technologies) y kappa de ratón (α KA57, SEQ ID NO: 57) y cebadura específica CH1 de ratón (JS300, SEQ ID NO:6), de acuerdo con los procedimientos del fabricante. Los primeros productos de la síntesis de cADN de hebra se purificaron más adelante, utilizando un dispositivo concentrador de membrana (Amicon Centri-con 30 o Millipore UltraFree 15). Del cADN recuperado, 3 μ l se usó como ADN de plantilla para PCR. Las reacciones de amplificación PCR típicas (100 μ l) que contienen ADN de plantilla, 50 pmoles de los cebadores apropiados (JSS9,

JSS10, JSS11, JSS12, JS153 y JSS154-SEQ ID NO: 9-12 para cadenas ligeras; JSS1, JSS2, JSS3, JSS4, JSS8 y Aka-143SEQ ID NO: 1-5 y SEQ ID NO: 15 para cadenas pesadas), 2,5 unidades de polimerasa ExTaq (PanVera), solución amortiguadora de reacción 1x ExTaq, dNTP 200 μ M, y $MgCl_2$ 2 mM. Cada una de las plantillas se desnaturalizó por una incubación inicial a 96°C durante 1 min. Los productos de cadena pesada se amplificaron por 40 ó 50 ciclos térmicos de 59 hasta 72°C durante 30 seg, 72°C durante 30 seg, luego 96°C durante 1 min. y una etapa de extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos de cadena ligera se amplificaron por 6 ciclos térmicos de 46, 48 o 54°C durante 30 seg, 72°C durante 30 seg, luego 96°C durante 1 min, seguido por 35 ciclos de etapa de 60°C durante 1 min, luego 96°C durante 1 min. y una etapa de extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos PCR de las reacciones exitosas se purificaron utilizando el sistema de purificación PCR Wizard (Promega) de acuerdo con el procedimiento del fabricante.

Los productos PCR de cadena ligera y cadena pesada (aproximadamente 400 pb) se clonaron después en un vector bacteriano para la determinación de la secuencia de ADN. Las ligaduras de los fragmentos PCR se llevaron a cabo en el vector clonado estilo T/A pCR2.1 (Invitrogen), siguiendo los procedimientos del fabricante y utilizando 1:1, 3:1 y 5:1 relaciones molares de inserto a vector. Una mitad de cada una de las reacciones de ligadura se usó para transformar células Blue XL1 competentes.

Los clones de plásmido de cadena pesada que contienen insertos de ADN se identificaron usando digestiones de enzima de restricción de diagnóstico con EcoRI (New England Biolabs). Entonces se determinaron las secuencias de ADN de plásmidos (tKMC217B) que contienen insertos del tamaño apropiado (400 pb). La secuencia de ADN de consenso final de las regiones variables de cadena pesada se muestra en la figura 3.

Los productos PCR de cadena ligera se identificaron diferentemente. La línea celular de hibridoma que expresa el anticuerpo "13C4" se hizo al fusionar esplenocitos de ratón con la línea celular de mieloma SP2/0. La línea celular SP2/0 transcribe un pseudogen para la cadena ligera kappa. El transcripto de pseudogen, cuando se convierte a cADN por RT-PCR, contiene un sitio de restricción AflIII. Los clones candidatos de cadena ligera (tKMC226 y 227) se digirieron con AflIII (New England Biolabs), utilizando los procedimientos del fabricante para identificar clones que contienen insertos del tamaño apropiado (403 pb; el sitio AflIII no está presente en estos productos). La secuencia de ADN de consenso final de las regiones variables de cadena ligera se muestra en la figura 3 con los CDR subrayados.

Ejemplo 2

Construcción del vector de expresión tKMC249A

Las regiones variables de cadena ligera y pesada se subclonaron a continuación en vectores de plásmido de expresión mamíferos para la producción de moléculas de anticuerpo de ratón/humanas quiméricas recombinantes. Los vectores tienen por resultado la producción de moléculas de anticuerpo recombinante bajo el control de promotores transcripcionales CMV. Las moléculas de cadena pesada son constructos de cADN directos que fusionan la secuencia de región variable directamente en el dominio constante IgG1 humano. Las moléculas de cadena ligera, por otra parte, tienen una región 3' de intrón kappa de ratón del fragmento que codifica la región variable. Después del empalme, la región variable vuelve a fusionarse a un exón de región constante kappa humano (Figura 4). El marcador seleccionable para el vector en células mamíferas es fosfotransferasa de aminoglicósido (neo), usando el fármaco G418 (CellTech).

A. Creación de los vectores de expresión

Para crear los vectores de expresión de cadena ligera y pesada se requieren ligaduras del fragmento de ADN y etapas de mutagénesis dirigidas al sitio. El resultado fue vectores que expresan ambas cadenas de anticuerpo con transcripción conducida por el promotor CMV. La resistencia de neomicina sirve como marcador seleccionable dominante para la transfección de células mamíferas. Además, estos vectores se han diseñado para permitir la clonación conveniente de cualquier región variable de cadena ligera como fragmento EcoRV/BstBI, cualquier región variable de cadena pesada como un fragmento NruI/EcoRI, y cualquier dominio constante de cadena pesada como un fragmento EcoRI/NotI. Estos sitios de restricción se eligieron debido a que raramente ocurren (si acaso algunas veces) en regiones variables de humano y ratón. Existe un fragmento intrón de región/kappa J de ratón fusionado a un exón kappa humano de manera que después del empalme post-transcripcional se produce una cadena ligera kappa quimérica humana de ratón. Finalmente, los vectores se diseñaron para facilitar la escisión (BglII/NheI) de un casete de expresión de anticuerpo completo de un vector para ligarse en un segundo corte del vector con BamHI/NheI, creando un vector de expresión con el aparato para ambas cadenas.

La estructura del vector fue el pCDNA3 plásmido (Invitrogen). Este plásmido se cortó con HindIII/XhoI y un fragmento de ADN de "poliligadura de cadena ligera" se insertó para crear el pCDNA3.LCPL de "vector de cadena ligera" inicial (ver figura 12). Esta ligadura contiene los sitios de restricción HindIII, KpnI, ClaI, PmlI, EcoRV, XmaI, BamHI y XhoI para facilitar las etapas de clonación posteriores. Un fragmento de ADN SmaII/BclII que contiene un líder de cadena ligera, fragmento genómico de cadena ligera kappa anti-CKMB de ratón, y 3'UTR se clonó en los sitios EcoRV/BamHI de pCDNA3.LCPL. El intrón kappa de ratón, exón, y 3'UTR en este fragmento se derivó de LCPXK2, recibido del Dr. Richard Near (Near, R. I. y col., 1990, *Mol. Immunol.* 27: 901-909). Después se realizó la mutagénesis para eliminar un sitio NruI (209), MluI (229), y BstBI (2962) y para introducir un NheI (1229) y un BamHI (1214) para crear el pCDNA3.mut.LCPL.LCVK plásmido (ver figura 12).

ES 2 339 618 T3

Un segundo pCDNA3mut.HCPL de “vector de cadena pesada” se construyó a partir del plásmido pCDNA3mut.LCPL.LCVK, al reemplazar la región de expresión de cadena ligera (HindIII/XhoI) por una “poliligadura de cadena pesada” que consiste de sitios de restricción HpaI, BspEI, EcoRV, KpnI, y XhoI. Este plásmido se digirió con EcoRV y KpnI. Un fragmento de ADN digerido SmaI/KpnI que contiene un líder de cadena pesada y un fragmento genómico de cadena pesada de ratón IgG2b anti-CKMB se ligó entonces en el plásmido digerido EcoRV/KpnI. Un fragmento de oligonucleótido KpnI/SalI que contiene una dirección ascendente 3’UTR y una NotI del sitio SalI se clonó posteriormente en el plásmido digerido KpnI/XhoI, (con genes inactivados del sitio XhoI), para crear el pCDNA3mut.HCPL.HCV2b plásmido (ver figura 13).

Un dominio constante de cadena ligera kappa humano se clonó entonces en pCDNA3mut.LCPL.LCVK como un fragmento EcoNI/XhoI que genera el tKMC 180C2 plásmido. Un dominio constante IgG1 humano se clonó en PSLTN 10 como un fragmento EcoRI/NotI, creando el pJRS313 plásmido. Las regiones variables de 13C4 se clonaron en estos dos vectores (como se describe arriba). Un fragmento BglII/NheI del vector de cadena pesada humano tKMC229C se clonó después en el BamHI/NheI de corte del vector de cadena ligera humano tKMC231D para crear tKMC249A (ver figura 4).

B. Subclonación de las regiones variables en los vectores de expresión

Los fragmentos del gen de región variable se volvieron a amplificar por PCR utilizando cebadores que adaptan los fragmentos para la clonación en los vectores de expresión (ver figura 2 y 4). El cebador frontal de cadena pesada (oKA143, SEQ ID NO: 15) incluye una cola 5’ que codifica la terminal C del líder de cadena pesada y un sitio de restricción NruI para la clonación, mientras que el cebador inverso de cadena pesada (oKA144, SEQ ID NO: 14) agrega un sitio de restricción 3’ EcoRI para la clonación. El cebador frontal de cadena ligera (oKA145, SEQ ID NO: 16) introduce un sitio de restricción EcoRV en la terminal N de la región variable de cadena ligera para la clonación, mientras que el cebador inverso de cadena ligera (oKA146, SEQ ID NO: 17) agrega una secuencia de ADN 3’ para la unión de empalme de exón kappa de región unida seguida por un sitio de restricción BstBI para la clonación.

Las reacciones PCR se realizaron con reactivos, como se describen arriba y con plantillas de 1-2 ng de plásmido digerido PvuI (New England Biolabs); cada una de estas plantillas se desnaturalizó por una incubación inicial de un minuto a 96°C. Los productos de cadena pesada se amplificaron por 35 ciclos térmicos de 55 ó 60°C durante 30 seg, 72°C durante 30 seg., luego 96°C durante 1 min y una etapa de extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos de cadena ligera se amplificaron por 8 ciclos térmicos de 55 ó 60°C durante 30 seg, 72°C durante 30 seg, luego 96°C durante 1 min seguido por 30 ciclos de etapa de 60°C durante 1 min, luego 96°C durante 1 min, y una etapa de extensión final a 72°C durante 5 min.

El producto PCR de cadena pesada 13C4 (aproximadamente 400 pb) se purificó utilizando columnas de purificación PCR Qiaquick (Qiagen), como se describen en las instrucciones del fabricante y posteriormente digeridas con NruI y EcoRI (New England Biolabs). Los productos PCR digeridos se purificaron utilizando el sistema de purificación PCR Wizard (Promega) de acuerdo con el procedimiento del fabricante y se ligaron en NruI/EcoRI digerido y pJRS313 purificado con gel, resultando en tKMC229C plásmido (ver figura 4). La secuencia de ADN de consenso final de la región variable de cadena pesada y el empalme propio de los sitios de restricción se confirmaron en este constructo.

El producto PCR de cadena ligera 13C4 (aproximadamente 350 pb) se purificó utilizando columnas de purificación PCR Qiaquick (Qiagen), como se describe en las instrucciones del fabricante y posteriormente se digirieron con EcoRV y BstBI (New England Biolabs). Los productos PCR digeridos se purificaron utilizando columnas de purificación PCR Qiaquick (Qiagen) de acuerdo con el procedimiento del fabricante y se ligaron en EcoRV/BstBI digerido y tKMC 180C2 purificado con gel (como se describe arriba), resultando en tKMC231D plásmido (ver figura 4). La secuencia de ADN de consenso final de la región variable de cadena ligera y el empalme propio de los sitios de restricción se confirmaron en este constructo.

Ejemplo 3

Producción estable de anticuerpo 13C4 de ratón/humano quimérico recombinante

A. Transfección de células NSO

El tKMC249A plásmido se transfectó en células NSO (Baxter International, Inc., Durante, CA) utilizando la electroporación después de la linearización con PvuI (New England Biolabs). Se mezclaron 40 microgramos del plásmido digerido con 1×10^7 células en un volumen total de 800 microlitros, en una cubeta de 0,4 centímetros y se sometieron a un pulso de 250 mA, 960 μ F. Las células fueron retiradas de las placas después de 24 horas y colocadas en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos, 6 placas con 200 μ L/pozo, y se incubaron a 37°C y CO₂ al 10%. Cuando las colonias aparecieron, se procesaron los sobrenadantes por ensayo para la producción del anticuerpo “humanizado” y para la capacidad del anticuerpo expresado de enlazar a Stx1.

B. Ensayo para la Producción del Anticuerpo

La producción del anticuerpo y los ensayos de actividad para los transfectantes estables se realizaron como se describe a continuación. Estos ensayos demuestran que la transfección de células con este constructo plásmido puede tener como resultado la producción de una línea celular estable que produce una versión quimérica humanizada del anticuerpo de hibridoma de ratón 13C4 (designado H13C4).

Se realizaron ensayos ELISA de producción de anticuerpo en tiras de 8 pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) cubiertas a una dilución 1:500 con anticuerpo IgG anti-humano de cabra (Pierce o Biotec International), utilizando una solución amortiguadora de cubierta Tris-HCl, pH 8.5. Las placas se cubrieron e incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron entonces una vez con una solución amortiguadora de almacenamiento precipitada (Tris-HCl/NaCl/NaN₃ al 0.1%). Se aplicaron entonces 50 microlitros de sobrenadante de cultivo a cada pocillo que se ha llenado previamente con 50 microlitros de un diluyente de muestra/conjugado (Tris-HCl/NaCl/Gelatina/Tween-20). Se permitió la incubación de las placas durante 30 hasta 60 minutos en un girador a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con una solución de lavado (imidazol/NaCl/Tween-20). Se diluyó un conjugado kappa-HRP anti-humano de cabra (Southern Biotechnologies) 1:250 en el diluyente de muestra/conjugado y se agregó 100 microlitros a los pocillos. Las placas se incubaron en un girador durante 30 hasta 60 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 6 veces utilizando la solución amortiguadora de lavado, y luego se incubaron con 100 µL/pozo de sustrato de desarrollo ABTS (Kirkgaard & Perry Laboratories) durante 8 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 µL/pozo de solución amortiguadora Quench diluida (Kirkgaard & Perry Laboratories). Se determinó el valor de absorbancia a 4005 nm utilizando un lector ELISA de placa microtitulada automatizado (Ceres UV900HI, Biotec, Winooski, Vermont). Los controles para el ensayo ELISA fueron una proteína de mieloma IgG1K humana (Biotec International) y el sobrenadante colectado de las células NSO no transfectadas. Este ensayo (ver Figura 8) demuestra que la transfección de células con este constructo de plásmido resulta en células que producen una molécula que contiene dominios tanto de cadena pesada humana (IgG) como de cadena ligera (kappa).

Los sobrenadantes se evaluaron entonces por la capacidad de los anticuerpos expresados de unirse a la proteína Stx1 por ELISA. Los ensayos de actividad se realizaron en tiras de 8 pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) cubiertas con aproximadamente 0.1 µg/pozo de Stx1 purificado recibido de Alison O'Brien (u obtenido como se describe en el Ejemplo 7). El recubrimiento de la placa y el procedimiento ELISA se realizaron de la misma manera que el ensayo de anticuerpo de arriba con la sustitución de TMB (Kirkgaard & Perry Laboratories) para ABTS como un sustrato de desarrollo. El valor de absorbancia a 450 nm se determinó utilizando un lector ELISA de placa de microtitulación automatizado (Ceres UV900HI, Biotec, Winooski, Vermont). Como un control positivo, se usó el anticuerpo monoclonal de ratón original 13C4, y se evaluó con un conjugado IgG anti-ratón de cabra (Jackson Laboratories) a una dilución 1:200. Este ensayo (ver Figura 9) demuestra que la transfección de células con este constructo de plásmido resulta en células que producen inmunoglobulina que se enlaza a Stx1. Ni el IgG I K de ratón ni el de humano que carecen de la región variable anti-Stx se unieron a la toxina.

Humanización del anticuerpo Anti-Stx2 EHEC: 11E10

Los siguientes ejemplos 4-7 se refieren al anticuerpo de variante Stx2 y anti-Stx2 11E10 y su contraparte humanizada H11E10.

Ejemplo 4

Clonación de los cADN de región variable 11E10

La línea de célula de hibridoma que produce el anticuerpo "11E10" (Anti-Stx2) se depositó el 1 de agosto de 1990, en la American Type Culture Collection, Rockville, MD bajo el No. de Acceso CRL 1907, y puede obtenerse de la ATCC, o, como aquí, del Dr. Alison O'Brien (para detalles de la preparación de hibridoma, ver Perera, L. P. y col., J. Clinical Microbiol., 26: 2127-2131 (1988). Un vial de la línea de célula se descongeló, lavó con medio libre de suero y luego se volvió a suspender en medio completo IMDM (Mediatech) complementado con FBS al 10% (Irvine).

Se aisló el ARN total de 1x10⁷ células "11E10" usando el kit de aislado de ARN RNeasy (Qiagen), siguiendo el procedimiento del fabricante. Se disolvió el ARN en Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM (pH 8.4) que contiene inhibidor de RNasa Prime 0.03 U/µg (5'-3') hasta una concentración final de 0.63 µg/µl.

La Figura 1 muestra la estrategia para clonar los fragmentos de gen de región variable y la Figura 5 enlista los cebadores de oligonucleótido usados. El ARN total de "11E10" (2.5 µg) se convirtió al cADN utilizando Transcriptasa Inversa 11-MMLV Superscript (Life technologies) de acuerdo con los procedimientos del fabricante. La cadena ligera de ratón (JS153, JS154, SEQ ID NO: 11 y 12) y cadena pesada de ratón (JS300, SEQ ID NO: 6) se usaron como cebadores específicos. Los productos de síntesis de cADN de primera hebra se purificaron entonces utilizando un dispositivo concentrador Centricon-30 (Amicon). De los 70 µl de cADN recuperados, se usó 3.5 µl como ADN de plantilla para PCR. Las reacciones de amplificación PCR típicas (100 µl) contenían el ADN de plantilla, 50 pmoles de los cebadores apropiados (JS153, JS154 y JS009, JS010, JS011, JS012, SEQ ID NO: 7-12 para las cadenas ligeras, JS160, JS161, JS162 y JS001, JS002, JS003, JS004, JS008, SEQ ID NO: 28-30, SEQ ID NO: 2-5 para cadenas pesadas), 2.5 unidades de polimerasa ExTaq (Pan Vera), solución amortiguadora de reacción 1x Ex Taq, dNTP 200 µM, y MgCl₂ 2 mM. La plantilla se desnaturalizó mediante una incubación inicial de cinco minutos a 96°C. Los

ES 2 339 618 T3

procedimientos se amplificaron por 35 ciclos térmicos de 96°C durante 1 min., 55°C durante 30 seg., y 72°C durante 30 seg., seguido por 5 min. a 72°C. Los productos PCR de las reacciones exitosas se purificaron utilizando el sistema de Purificación Wizard PCR (Promega) según el procedimiento del fabricante.

5 Los productos PCR de cadena pesada (aproximadamente 400 pb) y los productos PCR de cadena ligera (aproximadamente 350 pb) se clonaron entonces en un vector bacteriano para determinar la secuencia de ADN. Las ligaduras de los fragmentos PCR se llevaron a cabo en el vector de clonación estilo pCR2.1 T/A (Invitrogen) siguiendo los procedimientos del fabricante, utilizando un inserto de 3:1 a la relación molar de vector. Se usaron 2 µl de las reacciones de ligadura para transformar las células competentes IVαF⁺ (Invitrogen) según el procedimiento del fabricante. Los clones de plásmido que contienen insertos de ADN se identificaron usando digestiones de enzima de restricción de diagnóstico, con EcoRI (New England Biolabs). Se determinó entonces la secuencia de ADN de los plásmidos que contienen los insertos de cadena pesada del tamaño apropiado (400 pb). La secuencia de ADN de consenso final de la región variable de cadena pesada de 11E10 se muestra en la figura 6 con las CDR subrayadas.

15 Los clones de plásmido de cadena ligera necesitaban ser caracterizados adicionalmente debido a que la línea de célula de hibridoma que expresa el anticuerpo “11E10” se hizo fusionando esplenocitos de ratón con células mieloma SP20. La línea de célula SP20 transcribe un pseudogen para la cadena ligera kappa. El transcripto de pseudogen, cuando se convierte a cADN por RT-PCR, contiene un sitio de restricción AflIII. Por esta razón, los clones de plásmido para la región variable de cadena ligera se digirieron con AflIII y aquellos productos que no cortan se sometieron entonces a procesado por secuencia de ADN. La secuencia de consenso final de la región variable de cadena ligera se muestra en la Figura 6, con los CDR subrayados.

Los fragmentos de genes de región variable se volvieron a amplificar por PCR usando cebadores que adaptan los fragmentos para clonación en el vector de expresión (ver Figuras 5 y 7). El cebador frontal de cadena pesada (11E10HF, SEQ ID NO: 37) incluye una cola 5' que codifica la terminal C de la cadena pesada líder y un sitio de restricción NruI para clonación, mientras que el cebador inverso de cadena pesada (11E10HB, SEQ ID NO: 38) agrega un sitio de restricción 3'EcoRI para clonación. El cebador frontal de cadena ligera (11E10LF, SEQ ID NO: 39) incluye una cola 5' que codifica la terminal C de la cadena ligera líder y un sitio de restricción EcoRV en la terminal N de la región variable de cadena ligera para clonación, mientras el cebador inverso de cadena ligera (11E10LB, SEQ ID NO: 40) agrega una secuencia 3'ADN para la unión del cruce de empalme de exón de región kappa, seguido por un sitio de restricción BstBI para clonación. Se realizaron las PCR como se describe arriba excepto que, después de una incubación de 5 min., a 96°C, los parámetros PCR fueron 30 ciclos térmicos de 96°C durante 1 min., 62°C durante 30 segundos., y 70°C durante 30 seg., seguido por 5 min. a 72°C.

35 El producto PCR de región variable de cadena pesada se subclonó entonces en un vector plásmido de expresión de mamífero (pJRS315, producido como se establece a continuación, en el Ejemplo 5) para producción de moléculas de anticuerpo ratón/humano quiméricas recombinantes. El clon del vector resultante se designó pACE1. Antes de que la región variable de cadena ligera pudiera subclonarse en el vector de expresión de mamífero, se subclonó en el vector de clonación estilo pCR2.1 T/A previamente descrito. El plásmido resultante se designó pACELC y se digirió, con BstBI/EcoRV, para cortar la región variable de cadena ligera. La región variable se subclonó entonces en el vector de re-expresión de mamífero que contiene la región variable de cadena pesada “11E10” (pACE1). El clon del vector de expresión final se designó pACE4. Este vector resulta en la producción de moléculas de anticuerpo recombinante bajo el control de los promotores de transcripción CMV. Las moléculas de cadena pesada son constructos de cADN directos que fusionan la secuencia de región variable directamente en el dominio constante IgG1. Las moléculas de cadena ligera, por otro lado, tienen una región 3' de intrón kappa de ratón del fragmento de codificación de región variable. Después del empalme, la región variable se fusiona a un exón de región constante kappa humano (ver Figura 7). El marcador seleccionable para el vector en células de mamífero es neomicina (G418).

Para la producción de pACE1, el producto PCR de cadena pesada “1E10” (aproximadamente 400 pb) se digirió con NruI y EcoRI (New England Biolabs) purificado, utilizando una columna de Purificación PCR Qiaquick (Qiagen), como lo describe el fabricante, y se liga en NruI/EcoRI digerido y pJRS315 purificado por gel, lo que resulta en PACE1 plásmido (ver Figura 7). El producto PCR de cadena ligera “11E10” (aproximadamente 350 pb) se clonó en el vector de clonación T/A según las instrucciones del fabricante. El clon resultante, pACELC, se digirió con EcoRV y BstBI (New England Biolabs) y el fragmento de cadena ligera se purificó mediante gel. Este fragmento se ligó entonces en el EcoRV/BstBI digerido y pACE1 purificado con gel, lo que resulta en el plásmido pACE4 (ver Figura 7). La secuencia de las regiones variables de cadena pesada y ligera fue verificada antes de la transfección de célula de mamífero.

Ejemplo 5

60 Construcción del vector de expresión pJRS315

El plásmido pJRS315 es el plásmido de expresión en el que se clonaron las regiones variables del anticuerpo 11E10. Este plásmido es un derivado de un vector de expresión básico, plásmido pSUN15, que no contiene información de codificación de región variable de anticuerpo, pJRS315 se creó usando ligaduras de fragmento de ADN y etapas de mutagénesis dirigida al sitio. El resultado fue un vector que expresa ambas cadenas de anticuerpo con transcripción del conductor de promotor CMV (ver Figura 17). La resistencia de neomicina sirve como marcador seleccionable dominante para la transfección de células de mamífero. Además, se ha diseñado para permitir la clo-

nación conveniente de cualquier región variable de cadena ligera como un fragmento EcoRV/BstBI, cualquier región variable de cadena pesada como un fragmento NruI/EcoRI, y cualquier dominio constante de cadena pesada como un fragmento EcoRI/NotI. Estos sitios de restricción se eligieron debido a que se presentan raramente (si se da el caso) en regiones variables de humano y ratón. Este es un fragmento de intron de región J/kappa de ratón, fusionado a un exón kappa humano de manera que después del empalme posterior a la transcripción, se produce una cadena ligera kappa quimérica de ratón/humano.

La columna del vector fue el plásmido pCDNA3 (Invitrogen). Este plásmido se cortó con HindIII/XhoI y se insertó un fragmento de ADN “poliligador de cadena ligera” para crear el “vector de cadena ligera” de inicio. Este ligador contiene los sitios de restricción HindIII, KpnI, ClaI, PmlI, EcoRV, XamI, BamHI y XhoI para facilitar las etapas de clonación posteriores, con el fin de crear el plásmido pCDNA3.LCPL. Se clonó un fragmento de ADN SmaI/BclI que contiene un fragmento genómico de cadena ligera kappa anti-CKMB, líder de cadena ligera, y 3'UTR en los sitios EcoRV/BamHI de pCDNA3.LCPL. El intrón kappa de ratón, exón y 3'UTR en este fragmento se derivó de LCPXK2 recibido del Dr. Richard Near (Near, R.I. y col., Mol. Immunol. 27:901-909, (1990)). Se realizó entonces la mutagénesis para eliminar un NruI (209), MluI (229), y BstBI (2962) y para introducir un sitio NheI (1229) y un BamHI (1214) para crear pCDNA3mut.LCP.LCVK (ver Figura 12).

Se construyó un segundo “vector de cadena pesada” del plásmido pCDNA3mut.LCPL.LCVK al reemplazar la región de expresión de cadena ligera (HindIII/XhoI) por un “poliligador de cadena pesada” que consiste de los sitios de restricción HpaI, BspEI, EcoRV, KpnI, y XhoI. Este plásmido se digirió con EcoRV y KpnI. Un fragmento de ADN digerido SmaI/KpnI que contiene un líder de cadena pesada y un fragmento genómico de cadena pesada de ratón anti-CKMB IgG2b se ligó entonces en el plásmido digerido EcoRV/KpnI. El fragmento de oligonucleótido KpnI/SalI que contiene un 3'UTR y un NotI cadena arriba del sitio SalI se clonó posteriormente en el plásmido digerido KpnI/XhoI (que inactiva el sitio XhoI), para crear el plásmido pCDNA3mut.HCPL.HCV2b (ver Figura 13).

Desde este punto, se crearon dos vectores que no tienen ninguna de las secuencias variables anti-CKMB o de ADN de dominio constante. Esto se dio al cortar el plásmido pCDNA3mut.LCPL.LCVK con EcoRV/XhoI e insertar un fragmento de oligonucleótido ligador que contiene sitios EcoRV, BstBI, y XhoI para crear pSLJN9 (ver Figura 14). De manera similar, el fragmento anti-CKMB en pCDNA3mut.HCPL.HCV2b (NruI/NotI) se reemplazó por un fragmento de oligonucleótido ligador que contiene sitios NruI, EcoRI y NotI para crear pSUN10 (ver Figura 15). Se clonó entonces un dominio constante de cadena ligera kappa humano en pSUN9 como un fragmento BstBI/XhoI, y se clonó un dominio constante IgG1 humano en pSUN10 como un fragmento EcoRI/NotI.

El fragmento BglII/NheI del vector de cadena pesada humano se clonó entonces en el vector de cadena ligera humano, cortado con BamHI/NheI, para crear pSUN15 (ver Figura 16).

El plásmido pJRS315 se construyó entonces usando pSUN15 a través del siguiente proceso. Una región variable de cadena pesada de otra línea de célula de hibridoma, no relacionada (aproximadamente 400 pb), se digirió con NruI y EcoRI (New England Biolabs), se purificó utilizando una columna de purificación Qiaquick PCR (Qiagen), según lo descrito por el fabricante, y ligado en NruI/EcoRI digerido y pSUN15 purificado en gel, lo que da por resultado el plásmido pJRS311 (ver Figura 16).

En este punto, un fragmento de ADN BstBI/NotI (New England Biolabs) que contiene un fragmento de intron kappa-J kappa de ratón fusionado a un fragmento exón kappa humano se digirió y purificó en gel a partir del vector tKMC180C2. Este fragmento se ligó en la columna del pJRS311 digerido con BstBI/NotI y purificado en gel, lo que resulta en el plásmido pJRS315 (ver Figura 17).

Ejemplo 6

Producción estable de anticuerpo “11E10” de ratón/humano quimérico recombinante

A. Transfección de Células NSO

Se transfectó el plásmido pACE4 en células NSO usando electroporación. Se linealizó el plásmido con digestión de enzima de restricción PvuI. Se mezcló 40 µg del ADN de plásmido digerido con 70x10⁶ células en un volumen total de 400 µL y se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante un minuto. Se agregaron 10 µL de DMSO (Sigma) hasta una concentración final de 1.25%. La mezcla células/ADN/DMSO se transfirió a una cubeta de 0,4 centímetros fría y se sometió a un pulso de 250 voltios, 960 µF. Las células se transfirieron a un pocillo de una placa de seis pocillos que contiene 5 ml de medio no selectivo complementado con DMSO (concentración final de 1.25%). Después de 24 horas a 37°C y CO₂ al 10%, las células se colocaron en placas de 96 pocillos. Cuando las colonias aparecieron, los sobrenadantes fueron evaluados para la producción de anticuerpo “humanizado” y para que el anticuerpo expresado tenga la capacidad de unirse a la toxina Stx2.

B. Ensayo para Producción de Anticuerpos

La producción de anticuerpos y los ensayos de actividad para los transfectantes estables se realizaron en tiras de 8 pocillos de placas de 96 pocillos (Maxisorp F8; Nunc, Inc) cubiertas con una dilución 1:500 de anticuerpo anti-IgG F(ab')₂ anti-humano de cabra (Southern Biotechnology), usando una solución amortiguadora cubierta de bicarbonato,

ES 2 339 618 T3

pH 8.5. Las placas se cubrieron con película sensible a la presión (Falcon, Becton Dickinson) e incubó durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron entonces una vez con solución de lavado (imidazol/NaCl/Tween-20 al 0.4%). Se aplicó entonces 100 μ L de sobrenadante de cultivo y se permitió la incubación durante 30 minutos en un girador de placa a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cinco veces con una solución de lavado (imidazol/NaCl/Tween-20 al 0.4%). Se diluyó un conjugado kappa-HRP anti-humano de cabra (Southern Biotechnology) 1:800 en el diluyente muestra/conjugado y se agregó 100 μ L a las muestras, luego se incubó en el girador de placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron como arriba y luego se incubaron con 100 μ L por pocillo de sustrato de desarrollo ABTS (Kirkgaard & Perry Laboratories) y el valor de absorbancia a 405 nm, se determinó usando un lector de ELISA de placa de microtitulación automatizado (Ceres UV900HI, BioTek Instruments, Winooski, Vermont). Este ensayo (ver Figura 10) demuestra que la transfección de células con este constructo de plásmido tiene por resultado células que producen una molécula que contiene dominios tanto IgG como kappa humanos.

Los sobrenadantes se evaluaron entonces respecto a la capacidad de los anticuerpos expresados para unirse a la toxina EHEC Stx2. Se realizó el ensayo de actividad, como arriba, usando placas cubiertas en 1 μ g/ml con toxina Stx2 (obtenida como en el Ejemplo 7 del laboratorio del Dr. O'Brien) en una solución amortiguadora cubierta de bicarbonato, pH 8.5. Este ensayo demuestra que la transfección de células con este constructo de plásmido puede resultar en la producción de una versión quimérica humanizada del anticuerpo monoclonal de ratón 11E10, que une efectivamente el tipo 2 de toxina Shiga (Figura 11).

En conjunto, estos ensayos demuestran que la transfección de las células con este constructo de plásmido puede resultar en la producción de una línea de célula estable que produce una versión quimérica humanizada del anticuerpo de hibridoma de ratón 11E10.

Ejemplo 7

Verificación Biológica y Eficacia Inmunológica de Anticuerpos Humanizados para toxina Shiga

A. Ensayo de Citotoxicidad de Células Vero

La eficacia de los anticuerpos humanizados para toxina Shiga obtenida como se detalla en los Ejemplos 1 hasta 6 se determinó al evaluar su capacidad para proteger células Vero de toxina. Se realizaron ensayos de citotoxicidad esencialmente como está descrito por Gentry and Dalrymple, J. Clin. Microbiol, 12: 361-366 (1980). Brevemente, se obtuvo la toxina de cultivos de cepas K-12 de *E. coli* que contienen ya sea el plásmido pLPSH3 (que codifica Stx; J. Infect. Disease 164:344-352 (1991)) o pMJ 100 (que codifica Stx2; Inf. And Immunity, 57: 3743-3750 (1989)). Se rompieron las bacterias por lisis sónica y se clarificaron por centrifugación. Los extractos se diluyeron en serie en medio de cultivo de tejido (medio Eagle modificado de Dulbecco que contiene suero de becerro fetal al 10%, glutamina 0.8 mM, 500 U de penicilina G por ml, y 500 mg de estreptomycin por ml). Se agregaron 100 microlitros de diluciones de 10 pliegues de los lisados a los pocillos de la placa de microtitulación que contienen alrededor de 10^4 células Vero en 100 μ L de medio. Las células de cultivo de tejido se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 48 horas y luego se fijaron y teñieron con morado cristal. La intensidad de color de las células fijas y teñidas se midió con un lector Titertek a 620 nm. La incubación sin anticuerpo proporciona una curva de toxicidad estándar para el Stx.

B. Ensayo de Neutralización Antisuero

Los anticuerpos de ratón humanizados obtenidos de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 1 hasta 6 se probaron para neutralización de toxina. La neutralización de actividad citotóxica se describe en mayor detalle en Schmitt y col., Infect. And Immun., 59:1065-1073 (1991). Brevemente, se incubaron los lisados con diluciones en serie de los anticuerpos de ratón humanizados a 37°C durante 2 horas. Se agregaron entonces 100 microlitros de las muestras a células Vero como se describe arriba.

TABLA 1

Ensayo de Neutralización de Células Vero

	Anticuerpo	ng requerido para Neut. 1 CD ₅₀ *
	13C4 de ratón	25
	13C4 humanizado	26
	11E10 de ratón	2.7
	11E10 humanizado	82.8
	*(1CD ₅₀ = 1 pg de toxina pura)	

Ejemplo 8

*Inmunización Pasiva con Anticuerpos Humanizados*5 *A. Protección contra inyección con toxina Stx1 cruda*

El día cero, a unos grupos de cinco ratones CD-1 se les inyectó intraperitonealmente (0.1 ml) con anticuerpo H13C4 (α -Stx 1B humanizado), 13C4 (α -Stx1B de ratón), H11E10 (α -Stx2A humanizado), o solución salina amortiguada en fosfato (PBS). Estas inyecciones se repitieron el día 1. Se estimuló entonces a los ratones por inyección intravenosa
 10 con toxina Stx1 cruda (obtenida como se describe en el Ejemplo 7) en dosis de 1.7×10^5 ó 1.7×10^6 CD₅₀. Estas dosis de toxina se eligieron siguiendo los experimentos preliminares con cantidades variadas de toxinas. Los ratones se monitorizaron durante 21 días.

Los resultados (Tabla 2) muestran claramente que los anticuerpos inyectados protegen a los ratones contra al
 15 menos 10 veces la dosis de toxina letal normal. Como control negativo, los anticuerpos para Stx2 no protegen contra estimulación con toxina Stx1, lo que indica que la protección fue específica para el par toxina/anticuerpo, y no fue un utensilio del proceso de preparación del anticuerpo.

TABLA 2

20 *Ratones CD-1 Inyectados Intravenosamente con Stx1 Cruda*

25	Anticuerpo (dosis/ratón)	#LD ₅₀ Protegido Contra	µg/kg de Ab para Proteger de 1LD ₅₀
	13C4 de Murino (1.4 µg)	10	6.1
30	13C4 humanizado (4.1 µg)	20	8.9
	11E10 humanizado (232 µg)	0	Sin protección

*(1 LD₅₀ = 30 ng de Stx1 cruda)

35 *B. Protección contra infección oral con serie de EHEC que produce Stx2*

Se usaron dos cepas diferentes de ratones y bacterias en estos estudios para probar la eficacia contra tanto Stx2 como contra la variante Stx2. Se estimularon ratones DBA/2J con cepa EHEC 86-24 (O157:H7, Stx2⁺) y se estimularon
 40 ratones CD-1 con cepa B2F1 (O91:H21, variante Stx2*). Aunque la cepa B2F1 de *E. coli* normalmente es fatal para ambas series de ratones, la cepa 86-24 de *E. coli* es fatal para los ratones DBA/2J, mientras los ratones CD-1 sobrevivirán a la infección con 86-24.

El día cero, se inyectó el anticuerpo H11E10 (α -Stx2A humanizado) u 11E10 (α -Stx2A de ratón) intraperitoneal-
 45 mente (0.1 ml) en grupos de cuatro o cinco ratones. Los grupos de control incluyen ratones que han recibido anticuerpo 13C4 (α -Stx1B de ratón), ratones que han recibido fluido de ascitos 11E10 (α -Stx2A de ratón), o ratones que han recibido PBS en lugar de anticuerpo. A los ratones se les dio estreptomycin (5g/L) en su agua de beber para reducir la flora intestinal normal y se removió su alimento. Se hicieron crecer derivados resistentes a la estreptomycin de las cepas 86-24 (O157:H7, Stx2⁺) y B2F1 (O91:H21, Stx2-variante⁺) durante la noche en caldo L.

El día siguiente (día 1) los ratones recibieron una segunda inyección de anticuerpo de prueba, anticuerpo de control, o PBS. Los ratones se alimentaron inmediatamente con 10^{10} CFU de 86-24 que se había peletizado y vuelto a suspender en sacarosa al 20% o 10^3 CFU de B2F1 que se ha diluido en serie en sacarosa al 20%. Se devolvió el alimento a la
 50 jaula y se vigiló a los ratones durante 21 días. (CFU=Unidades que Forman la Colonia).

Como se muestra en la Tabla 3, la inmunización de los ratones con los anticuerpos anti-Stx2, ya sea de murino o humanizados, resulta en la protección completa de una dosis oral letal de EHEC. La inmunización con anticuerpo 13C4 de ratón, preparado de la misma manera pero inmunoreactivo con la toxina Stx1 en lugar de la toxina Stx2 no
 55 protegió a los ratones de la estimulación con 86-24, un resultado que indica la inmunoespecificidad de la respuesta.

ES 2 339 618 T3

TABLA 2

Ratones DBA/2J Alimentados 101°CFU0157 (Stx2)

5	Anticuerpo (dosis/ratón)	Sobrevivientes
	13C4 de Murino (1.4µg)	0/5
	11E10 de Murino (1.0µg)	5/5
10	11E10 humanizado (1.0µg)	5/5

Se ilustran resultados similares en la Tabla 4, donde los ratones CD-1 más resistentes se alimentaron con la cepa *E. coli* B2F1 que produce la toxina variante Stx2. Sin tratamiento con anticuerpo, la mortalidad fue total, pero los anticuerpos tanto humanizados como de ratón protegen contra la variante Stx2 en una manera dependiente de la dosis.

TABLA 3

Ratones CD-1 Alimentados 103 CFU O91 (variante Stx2)

	Anticuerpo (dosis/ratón)	Sobrevivientes
25	PBS	0/5
	11E10 de Murino (8.7µg)	1/4*
	11E10 de Murino (6.45mg)	5/5
30	11E10 humanizado (23.2µg)	0/5
	11E10 humanizado (232µg)	5/5

Dosis protectora entre 10.0 y 1.0 mg/kg

**Tiempo medio de retraso de la muerte de 3.4 días*

Ejemplo 9

Tratamiento de enfermedad causada por bacterias que producen la toxina Shiga

Los solicitantes describen además una variedad de métodos para tratar, aminorar, o prevenir las enfermedades y efectos asociados con la exposición a toxina Shiga. Se han obtenido respuestas clínicas positivas en humanos con anticuerpos monoclonales, y alguien experto en la técnica sabría como emplear los anticuerpos monoclonales humanizados anti-Stx en humanos, (ver Fagerberg y col., Cancer Research, 55:1824-27 (1995); Eur. J. Cancer, 2:261-267 (1995)). La dosificación precisa del anticuerpo de toxina anti-Shiga humanizado administrado a un paciente para el tratamiento de estas enfermedades variará de acuerdo con factores apreciados por el médico típico. Estos factores incluyen (pero no se limita a), talla, edad, salud general, la extensión de la infección, y otros medicamentos administrados al paciente. El desarrollo de un régimen de tratamiento preciso requerirá la optimización a través de procedimientos médicos de rutina, bien conocidos por aquellos en las técnicas médicas. Los ejemplos de grupos de pacientes potenciales incluirían (pero no se limita a) niños pequeños con diarrea sangrante pero sin glóbulos blancos en las heces, pacientes con indicaciones de HUS, pacientes con pruebas de muestra de heces positivas para toxina Shiga, grupos de hermanos o de una guardería en contacto con un caso (como una medida preventiva pasiva), y cualquier paciente con diarrea (no necesariamente sangrante) que haya estado en contacto con un caso identificado. Se contemplaría una dosificación típica de alrededor de 5 mg/kg de peso corporal de 13C4 humanizado combinado con alrededor de 10 mg/kg de peso corporal de 11E10 humanizado. Esta formulación combinada podría administrarse al paciente dos veces para asegurar su efectividad. La inclusión de ambos tipos de anticuerpos humanizados en conjunto proporciona seguridad de que el paciente estará protegido contra todos los tipos de toxina Shiga descritos en la presente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende un primer anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a la proteína de toxina Shiga tipo 1 (Stx1) y un segundo anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a la proteína de toxina Shiga tipo 2 (Stx2), en donde el primer anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina humana y comprende las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, como se establecen en las SEQ ID NOs: 19 y 21 y en donde el segundo anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina humana y comprende las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, como se establecen en las SEQ ID NOs: 42 y 44.

2. Una composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende un primer anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a Stx1 y un segundo anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza al antígeno Stx2, en donde la región variable del segundo anticuerpo comprende la región variable del anticuerpo 11E10 de murino con No. de Acceso al ATCC CRL 1907 y la región variable del primer anticuerpo comprende la región variable del anticuerpo 13C4 de murino con No. de Acceso al ATCC CKL 1794.

3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el primero o segundo anticuerpo comprenden una región constante humana seleccionada del grupo que consiste de IgG, IgA, e IgM.

4. La composición farmacéutica según la reivindicación 3, **caracterizada** porque la región constante humana del primero o segundo anticuerpo monoclonal es IgG.

5. La composición farmacéutica según la reivindicación 3, **caracterizada** porque la región constante humana del primero o segundo anticuerpo monoclonal es IgG1-kappa.

6. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5, **caracterizada** porque además comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

7. El uso de una composición que comprende un primer anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a la proteína Stx1 y un segundo anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a la proteína Stx2, en donde el primer anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina humana y comprende las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, como se establecen en las SEQ ID NOs: 19 y 21 y en donde el segundo anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina humana y comprende las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, como se establecen en las SEQ ID NOs: 42 y 44 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección que resulta en síndrome de uremia hemolítico provocado por *Escherichia coli* enterohemorrágica u otras bacterias que producen la toxina Shiga.

8. El uso de una composición que comprende un primer anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a Stx1 y un segundo anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza al antígeno Stx2, en donde la región variable del segundo anticuerpo comprende la región variable del anticuerpo 11E10 de murino con el No. de Acceso al ATCC CRL 1907 y la región variable del primer anticuerpo comprende la región variable del anticuerpo 13C4 de murino con el No. de Acceso al ATCC CKL 1794 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección que resulta en síndrome de uremia hemolítico provocado por *Escherichia coli* enterohemorrágica u otras bacterias que producen la toxina Shiga.

9. El uso según la reivindicación 7 u 8, en donde el primero o segundo anticuerpo comprende una región constante humana seleccionada del grupo que consiste de IgG, IgA, e IgM.

10. El uso según la reivindicación 9, en donde la región constante humana del primero o segundo anticuerpo monoclonal es IgG, preferiblemente IgG1-kappa.

11. Una composición **caracterizada** porque comprende un primer anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a la proteína Stx1 y un segundo anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a la proteína Stx2, en donde el primer anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina humana y comprende las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, como se establecen en las SEQ ID NOs: 19 y 21 y en donde el segundo anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina humana y comprende las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina, como se establecen en las SEQ ID NOs: 42 y 44 para el tratamiento o prevención de una infección que resulta en síndrome de uremia hemolítico provocado por *Escherichia coli* enterohemorrágica u otras bacterias que producen la toxina Shiga.

12. Una composición **caracterizada** porque comprende un primer anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza a Stx1 y un segundo anticuerpo monoclonal humanizado que enlaza al antígeno Stx2, en donde la región variable del segundo anticuerpo comprende la región variable del anticuerpo 11E10 de murino con No. de Acceso al ATCC CRL 1907 y la región variable del primer anticuerpo comprende la región variable del anticuerpo 13C4 de murino con No. de Acceso al ATCC CKL 1794, para tratar o prevenir una infección que resulta en síndrome de uremia hemolítico provocado por *Escherichia coli* enterohemorrágica u otras bacterias que producen la toxina Shiga.

ES 2 339 618 T3

13. La composición farmacéutica según la reivindicación 11 ó 12, **caracterizada** porque el primero o segundo anticuerpo comprende una región constante humana seleccionada del grupo que consiste de IgG, IgA, e IgM.

5 14. La composición farmacéutica según la reivindicación 13, **caracterizada** porque la región constante humana del primero o segundo anticuerpo monoclonal es IgG, preferiblemente IgG1-kappa.

10

15

20

25

30

35

40

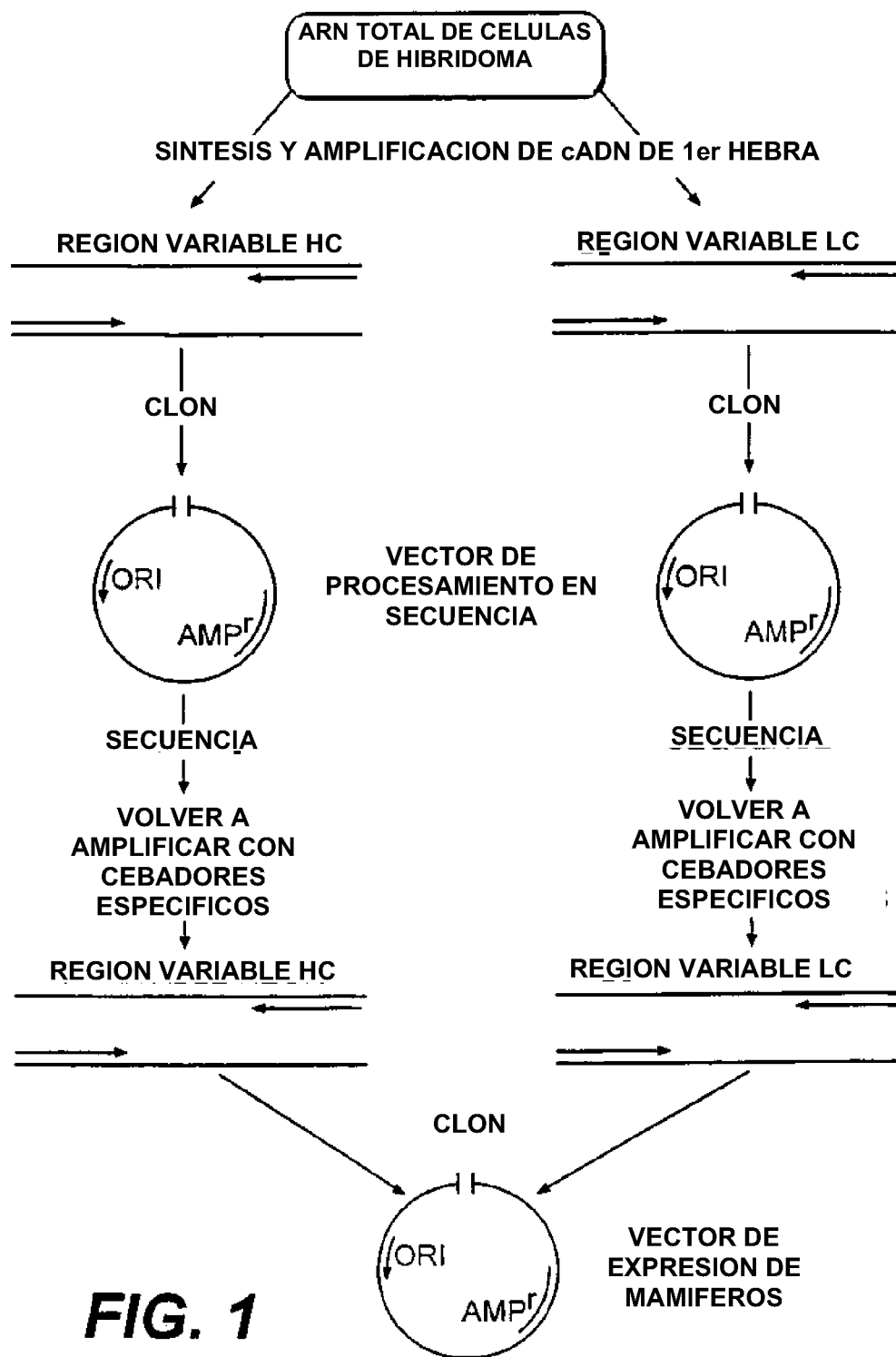
45

50

55

60

65



CEBADORES "FRONTALES" DE CADENA PESADA DE RATON

JSS1
 5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGARGTRMAGCTKSAKGAGWC-3' SEQ ID NO.1
 JSS2
 5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGARGTYCARCTKCARCARYC-3' SEQ ID NO.2
 JSS3
 5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGTGAAGCTKSTSGARTC-3' SEQ ID NO.3
 JSS4
 5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAVGTGMWGCTKGTGGAGWC-3' SEQ ID NO.4
 JSS8
 5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGTBCARCTKMARSARTC-3' SEQ ID NO.5

CEBADORES "TRASEROS" DE CADENA PESADA DE RATON

JS300
 5'-GAARTAVCCCTTGACCAGGC-3' SEQ ID NO.6

CEBADORES "FRONTALES" LIDERES DE CADENA PESADA DE RATON

JSS009
 5'-GGAGCGCGCGTTCTGACATTGTGMTGWCMCARTC-3' SEQ ID NO.7
 JSS010
 5'-GGAGCGCGCGTTCTGATRITTKYGATGACBCARRC-3' SEQ ID NO.8
 JSS011
 5'-GGAGCGCGCGTTCTGAYATYMGATGACMCAGWC-3' SEQ ID NO.9
 JSS012
 5'-GGAGCGCGCGTTCTSA AATTGWKCTSACYCAGTC-3' SEQ ID NO.10

FIG. 2A

CEBADORES "TRASEROS" DE CADENA LIGERA DE RATON

JS153

5'-TTCATAGGCGGCCGCACTAGTAGCMCGTTTCAGYTCCARC-3' SEQ ID NO.11

JS154

5'-TTCATAGGCGGCCGCACTAGTAGCMCGTTTKATYTCCARC-3' SEQ ID NO.12

OKA57

5'-GCACCTCCAGATGTTAACTGCTC-3' SEQ ID NO.13

CEBADORES ESPECIFICOS "13C4"

OKA144

5'-CTTGATCGCGACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG-3' SEQ ID NO.14

OKA143

5'-GGTATGGAATTCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3' SEQ ID NO.15

OKA145

5'-GGTTCTGATATCGTGATGTCCCAGTCTCACAAATTC-3' SEQ ID NO.16

OKA146

5'-GACATATTCGAAAAGTGTAAGTTACGTTTCAGCTCCAGACTGG-3' SEQ ID NO.17

FIG. 2B

REGION VARIABLE DE CADENA PESADA 13C4 ANTI-ST1

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGGGCTCTGGGGCTCAGTGAGGATG	SEQ ID NO.18
Q V Q L Q E S G A E L V R S G A S V R M	SEQ ID NO.19
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACA	
S C D A S G Y T F T <u>S Y N M H</u> W V K Q T	
CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATATTTATCCTGAAATGGTGGTACTAACTAC	
P G Q G L E W I G <u>Y I Y P G N G G T N Y</u>	
ATTCAGAAATTTAAGGGCAAGGCCATATTGACTGCAGACACATCCTCCAGCACAGCCTAC	
<u>I Q K F K G K A I L T A D T S S S T A Y</u>	
ATGCAGATCAGCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTTCTGTACAAGAAGTCCCTCT	
M Q I S S L T S E D S A V Y F C T R <u>S P S</u>	
CACTACAGTAGTGACCCCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA	
<u>H Y S S D P Y F D Y</u> W G Q G T T L T V S S	

REGION VARIABLE DE CADENA LIGERA 13C4 ANTI-ST1

GATATCGTGATGTCCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTCGGAGACAGGGTCAGCATC	SEQ ID NO.20
D I V M S Q S H K F M S T S V G D R V S I	SEQ ID NO.21
ACCTGTAAGGCCAGCCAGGATGTGGGTACTGCTGTTGCCCTGGTATCAGCAGAATCCAGGACAA	
T C K <u>A S Q D V G T A V A W Y Q Q N P G Q</u>	
TCTCCTAAATTTCTGATTTACTGGGCATCCACACGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACA	
S P K F L I Y <u>W A S T R H T</u> G V P D R F T	
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCA	
G S G S G T D F T L T I T N V Q S E D L A	
GATTATTTCTGTGAGCAATATAGCAGTTATCCTCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAGTCTGGAG	
D Y F C <u>Q Q Y S S Y P L T</u> F G A G T S L E	
CTGAAACGT	
L K R	

FIG. 3

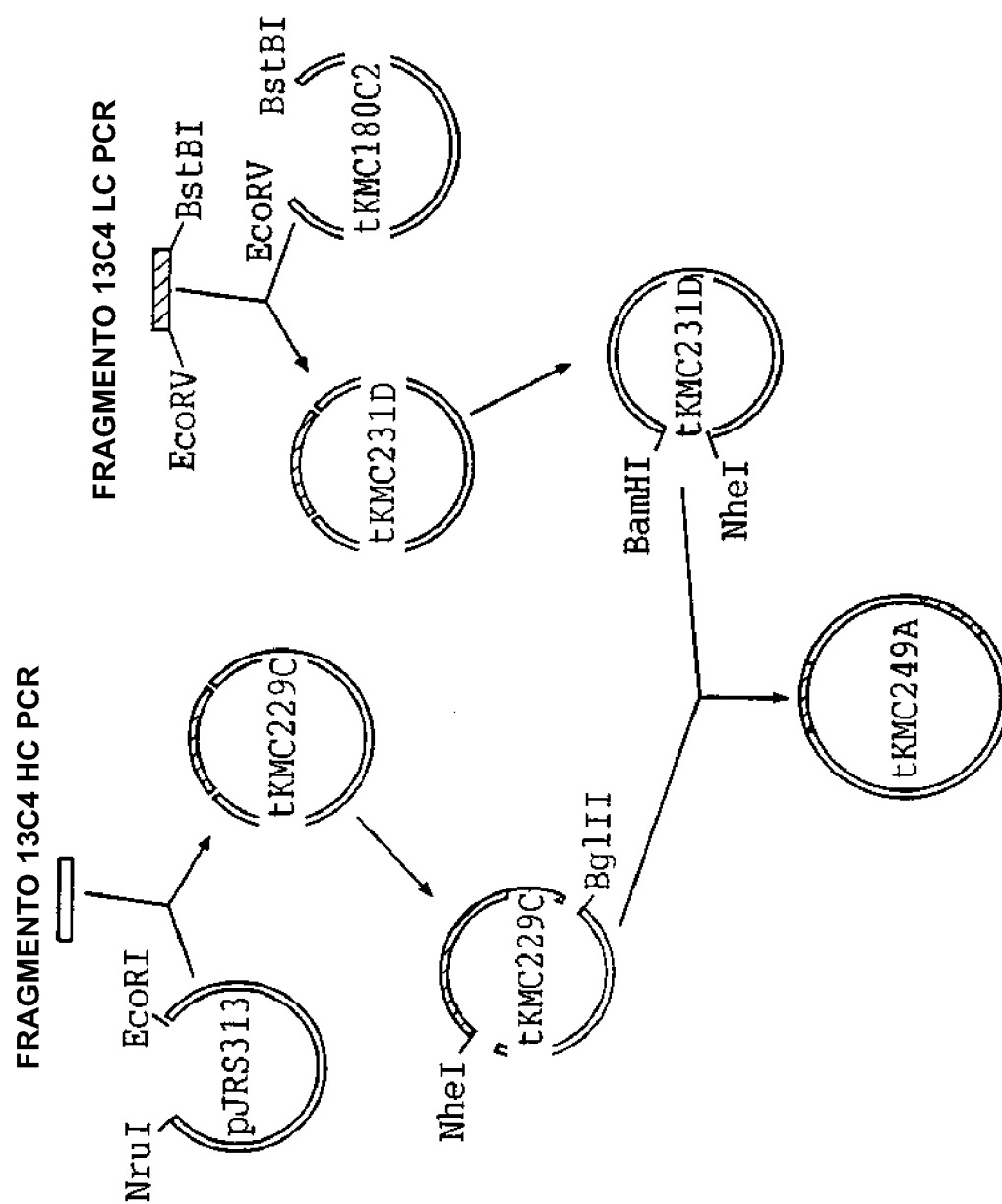


FIG. 4

CEBADORES "FRONTALES" DE CADENA PESADA DE RATON

JS001

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGARGTRMAGCTKSAKGAGWC-3' SEQ ID NO.22

JS002

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGARGTYCARCTKCARCARYC-3' SEQ ID NO.23

JS003

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGTGAAGCTKSTSGARTC-3' SEQ ID NO.24

JS004

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAVGTGMWGCTKGTGGAGWC-3' SEQ ID NO.25

JA008

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGTBCARCTKMARSARTC-3' SEQ ID NO.26

CEBADORES "TRASEROS" DE CADENA PESADA DE RATON

JS300 5'-GAARTAVCCCTTGACCAGGC-3' SEQ ID NO.27

JS160 5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASTGARG-3' SEQ ID NO.28

JS161 5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASMGTRG-3' SEQ ID NO.29

JS162 5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASCAGRG-3' SEQ ID NO.30

CEBADORES "FRONTALES" LIDERES DE CADENA PESADA DE RATON

JS009 5'-GGAGGCGGCGGTTCTGACATTGTGMTGWCMCARTC-3' SEQ ID NO.31

JS010 5'-GGAGGCGGCGGTTCTGATRTTKYGATGACBCARRC-3' SEQ ID NO.32

JS011 5'-GGAGGCGGCGGTTCTGAYATYMAGATGACMCAGWC-3' SEQ ID NO.33

JS012 5'-GGAGGCGGCGGTTCTSAATGKCTSAKYCAGTC-3' SEQ ID NO.34

FIG. 5A

CEBADORES “TRASEROS” DE CADENA LIGERA DE RATON

JS153 5' -TTCATAGGCGGCCGCGCACTAGTAGCMCGTTTCAGYTCCARC-3' SEQ ID NO.35
JS154 5' -TTCATAGGCGGCCGCGCACTAGTAGCMCGTTTKATYTCCARC-3' SEQ ID NO.36

CEBADORES ESPECIFICOS “11E10”

11E10HF SEQ ID NO.37
5' -ATATACTTCGCGACAGCTACAGGTGTCCACTCCGAAGTCCAAGTCAACAGCC-3'
11E10HB
5' -ATTAATGAAATTCGCGGAGACGGTGAGAGTGGTC-3' SEQ ID NO.38
11E10LF
5' -TTAAATGATATCGTGCTGTCACAATCTCC-3' SEQ ID NO.39
11E10LB
5' -TAATCGTTCGAAAAGTGTA CTTACGTTTCAGTTCAGCTTGGTCC-3' SEQ ID NO.40

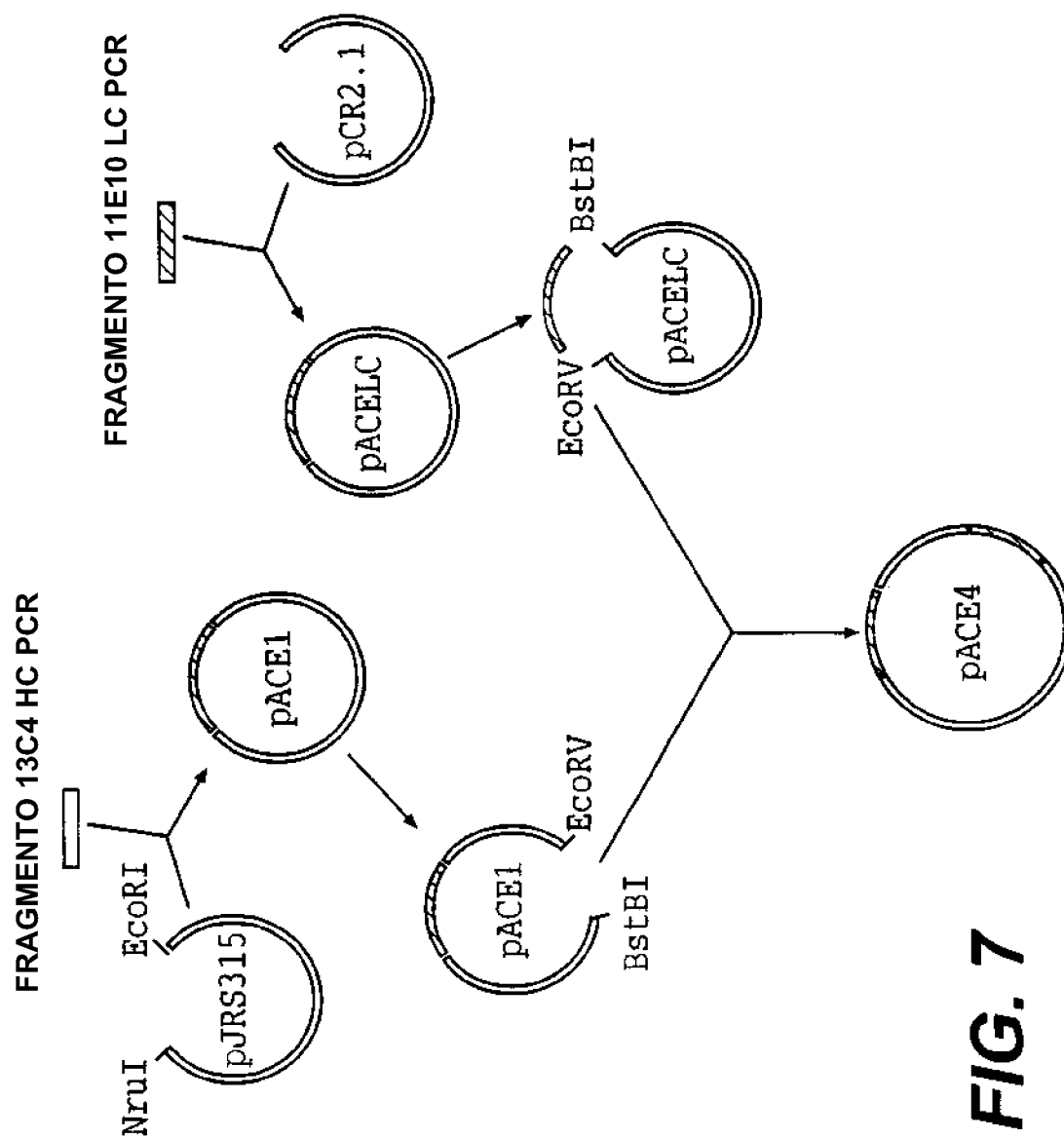
FIG. 5B

CADENA LIGERA 11E10		7/23/97 12:38 PM										SUBRAYADO DOBLE = CDRS										SEQ ID NO.41-42										
		10	20	30	40	50	60	70	80																							
21	11E10	GACATTGTGC TGTCAACAATC TCCATCCTCC CTAGTTGTGT CAGTTGGAGA GAAGGTACT ATGAGCTGCA AGTCTAGTCA																														
27		D I V L S Q S P S S L V V S V G E K V T M S C K S S Q																														
		90	100	110	120	130	140	150	160																							
21	11E10	GAGCCTTTTA TATAGTAGAA ATCAAAAGAA CTACTTGGCC TGGTACCAGC AGAACCAGG GCAGTCTCTT AAAGTGTCTGA																														
27		S L L Y S R N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S R K V L																														
		170	180	190	200	210	220	230	240																							
21	11E10	TTTACTGGCC ATCTACTAGG GAATCTGGGG TCCCTGATCG CCTCACAGGC AGTGGATCTG GGACAGATTT CACTCTCACC																														
27		I Y W A S T R E S G V P D R L T G S G S G T D F T L T																														
		250	260	270	280	290	300	310	320																							
21	11E10	ATCAGCAGTG TGAAGGCTGA AGACCTGGCA GTTTATTACT GTCAGCAATA TTATAGTTAT CCGCTCACGT TCGGTGCTGG																														
27		I S S V K A E D L A V Y Y C Q Q Y Y S Y P L T F G A G																														
		330	340	350	360	370	380	390	400																							
21	11E10	GACCAAGCTG GAGCTGAAA																														
27		T K L E L K																														

FIG. 6A

CADENAPESADA 11E10 7/23/97 12:36 PM		SUBRAYADO DOBLE = CDRs										SEQ ID NO.43-44	
		10	20	30	40	50	60	70	80				
1 11E10	GAAGTCCAAC TGCACAGCC TGGACCTGAG CTGGAGAGCC CTGGCGCTTC AGTGAAGCTA TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA												
11	E V Q L Q Q P G P E L E K P G A S V K L S C K A S G Y												
	90 100 110 120 130 140 150 160												
1 11E10	CTCTTTCACT GACTACAACA TGAACCTGGT GAAGCAGAAC AATGGAGAGA GCCTTGAGTG GATTGCAAAA ATTGATCCTT												
11	S F T D Y N M N W V K Q N N G E S L E W I G K I D P												
	170 180 190 200 210 220 230 240												
1 11E10	ACTATGGTGG TCCTAGCTAC AACCAGAAGT TCAAGGACAA GGCCACATTG ACTGTAGACA AGTCTTCCAG CACAGCCTAC												
11	Y Y G G P S Y N Q K F K D K A T L T V D K S S S T A Y												
	250 260 270 280 290 300 310 320												
1 11E10	ATGCAGTTCA AGAGCTGAC ATCTGAGGAC TCTGCAGTCT ATTACTGTAC AAGAGGGGA AATAGGACT GGTACTTCGA												
11	M Q F K S L T S E D S A V Y Y C T R G G N R D W Y F D												
	330 340 350 360 370 380 390 400												
1 11E10	TGTGTGGGC GCAGGGACCA CGCTCACCGT CTCGGCA												

FIG. 6B



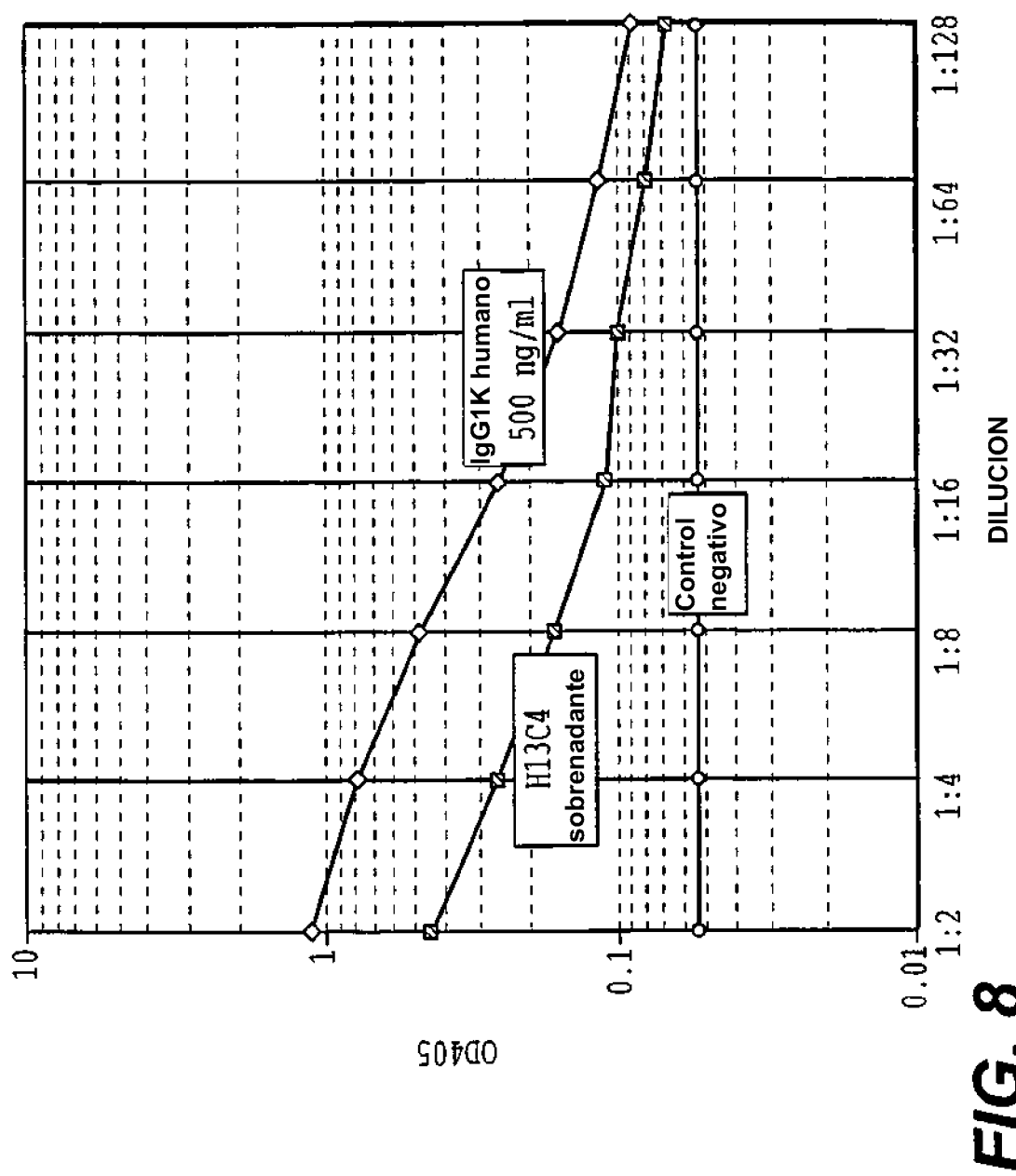


FIG. 8

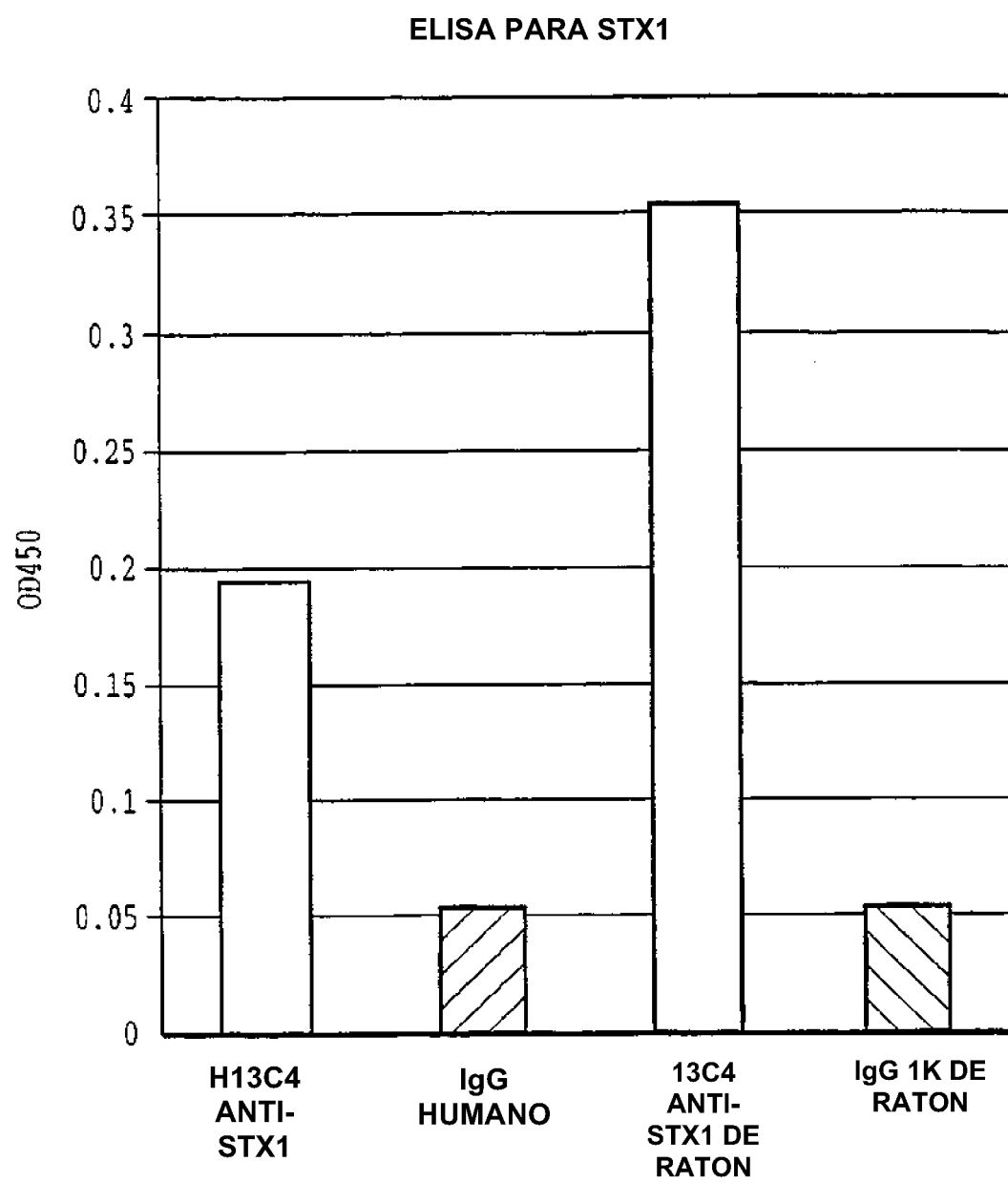


FIG. 9

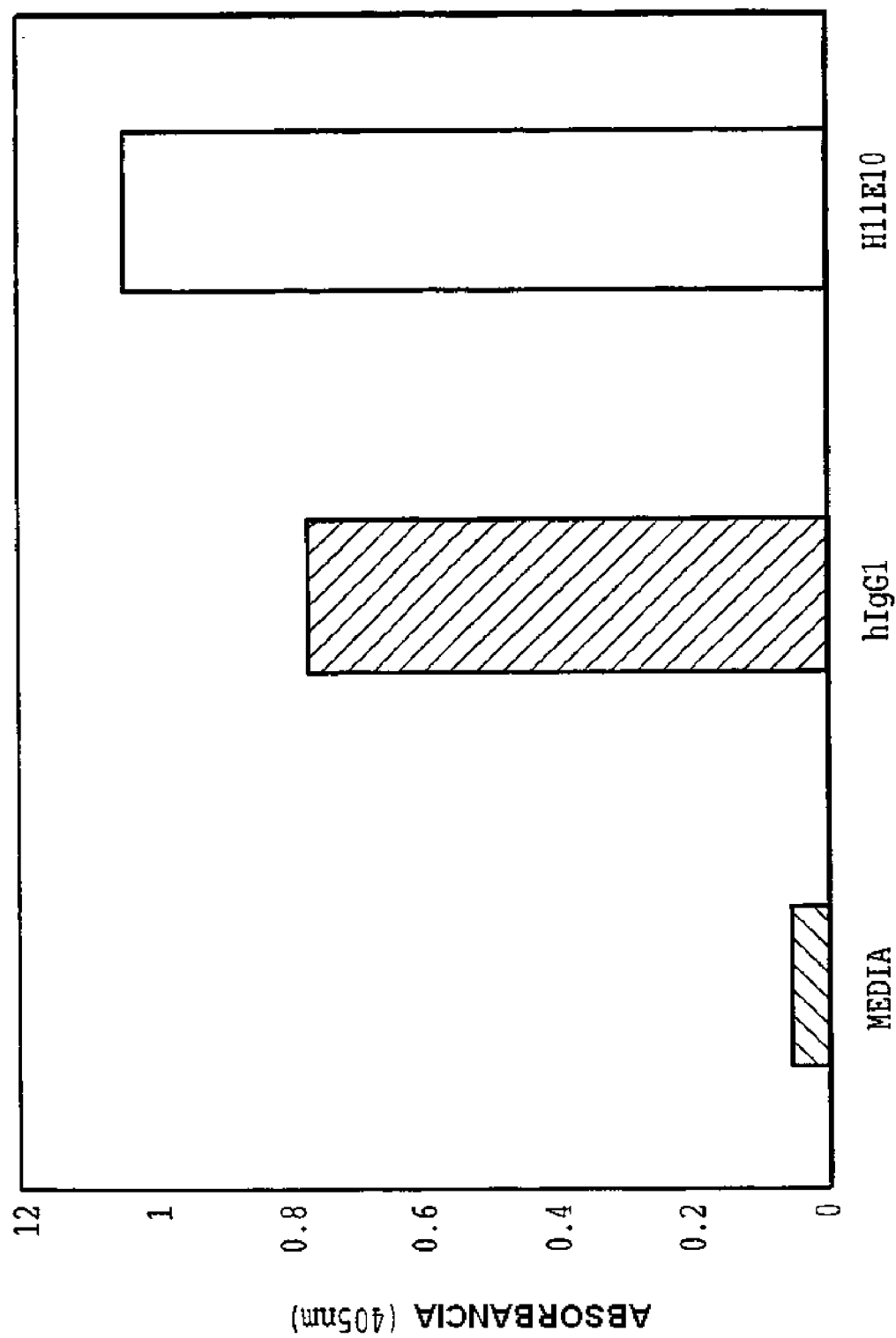


FIG. 10

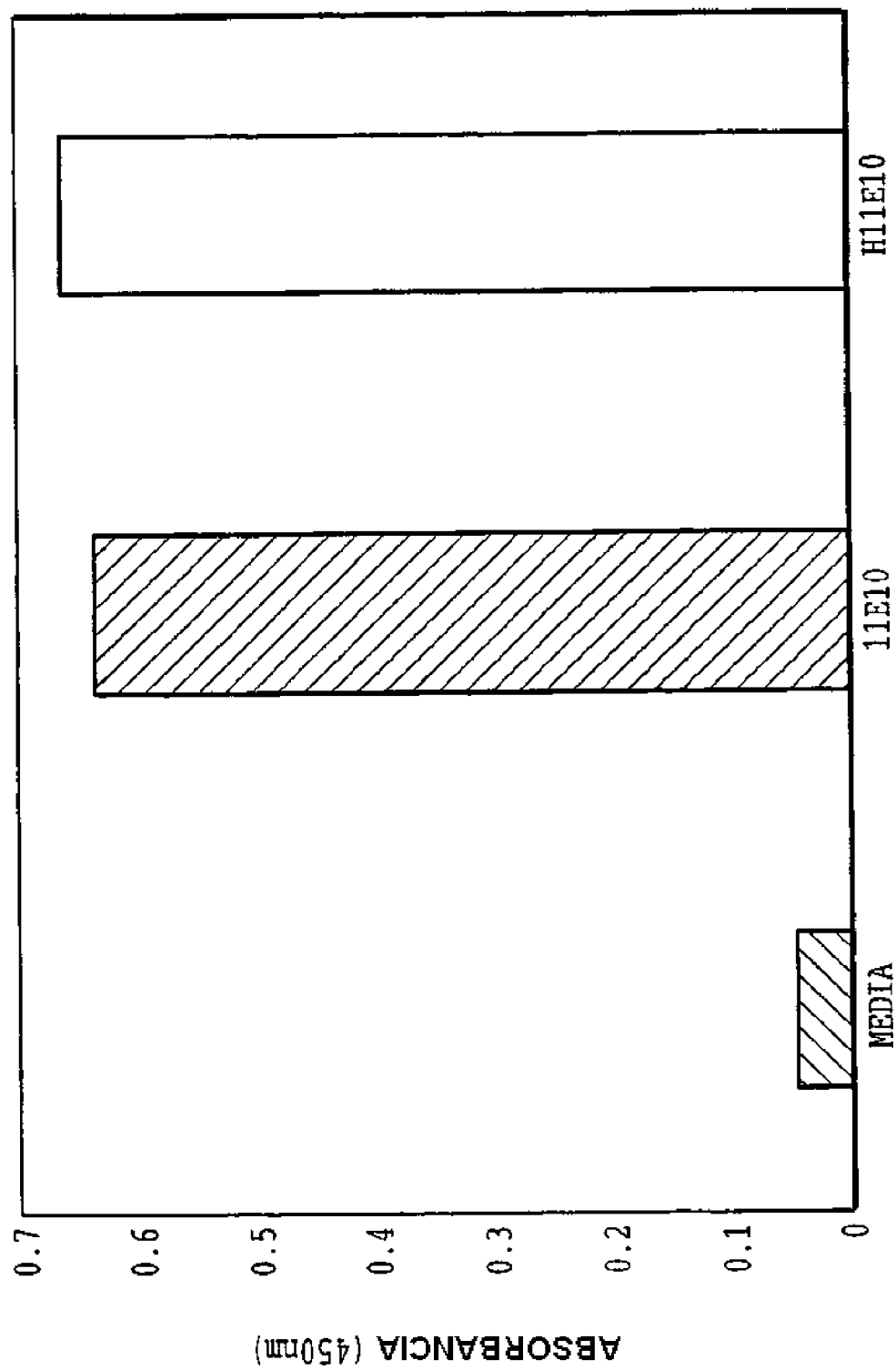


FIG. 11

**Construcción
pCADN3mut.LCPL.LCVK:**

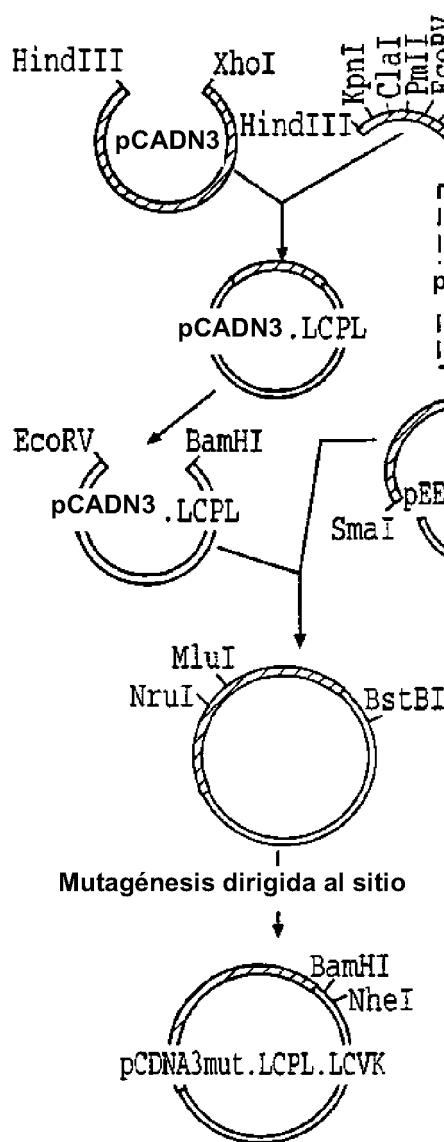


FIG. 12

**Construcción
pCADN3mut.HCPL.HCV2b:**

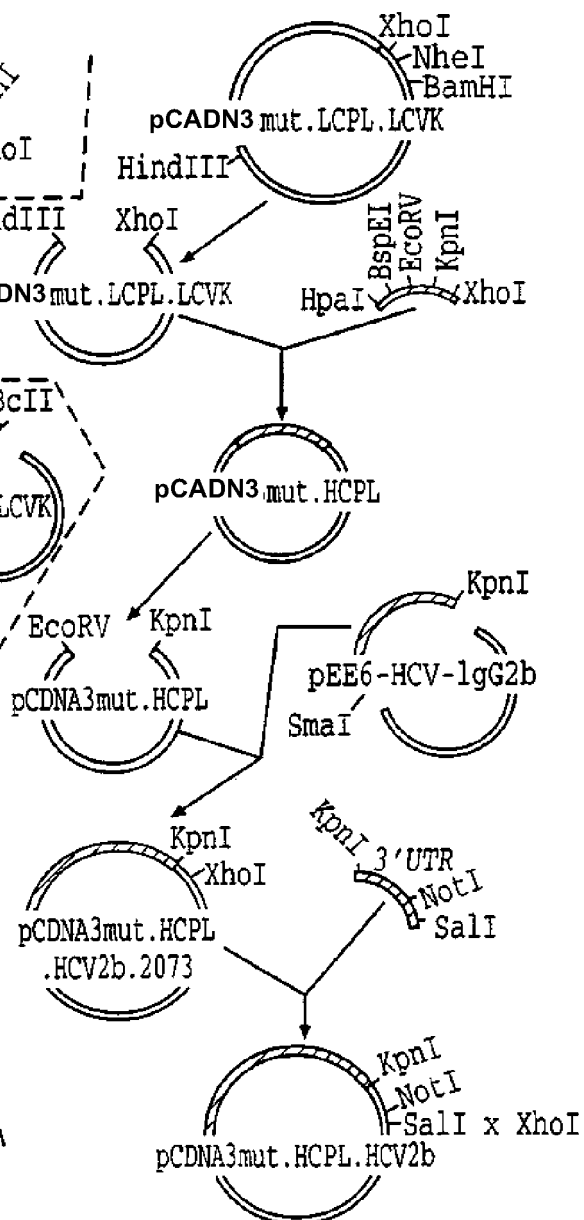


FIG. 13

**Construcciones pSUN9, /kappa y pSUN10,
10:IgG1:**

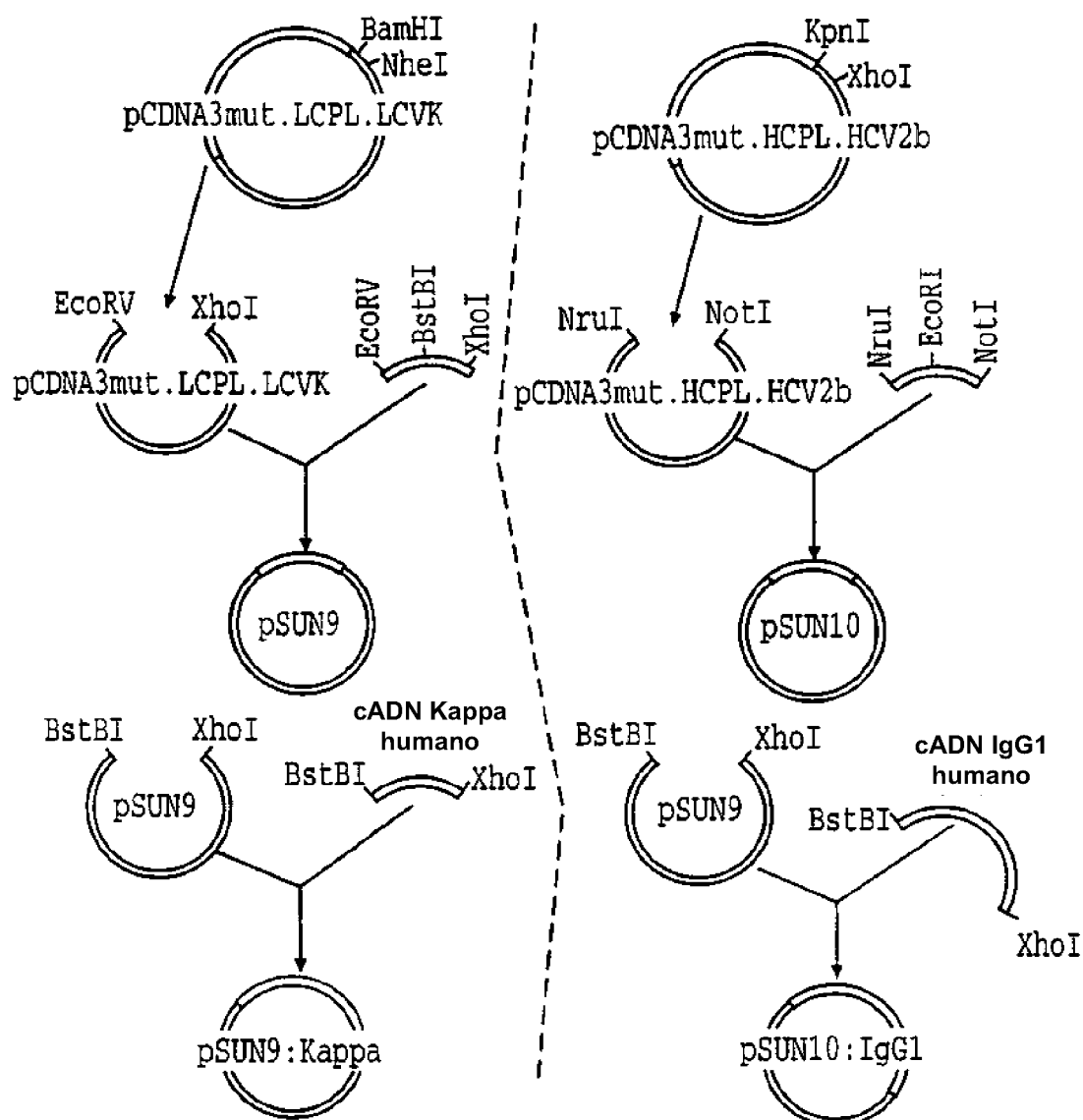


FIG. 14

FIG. 15

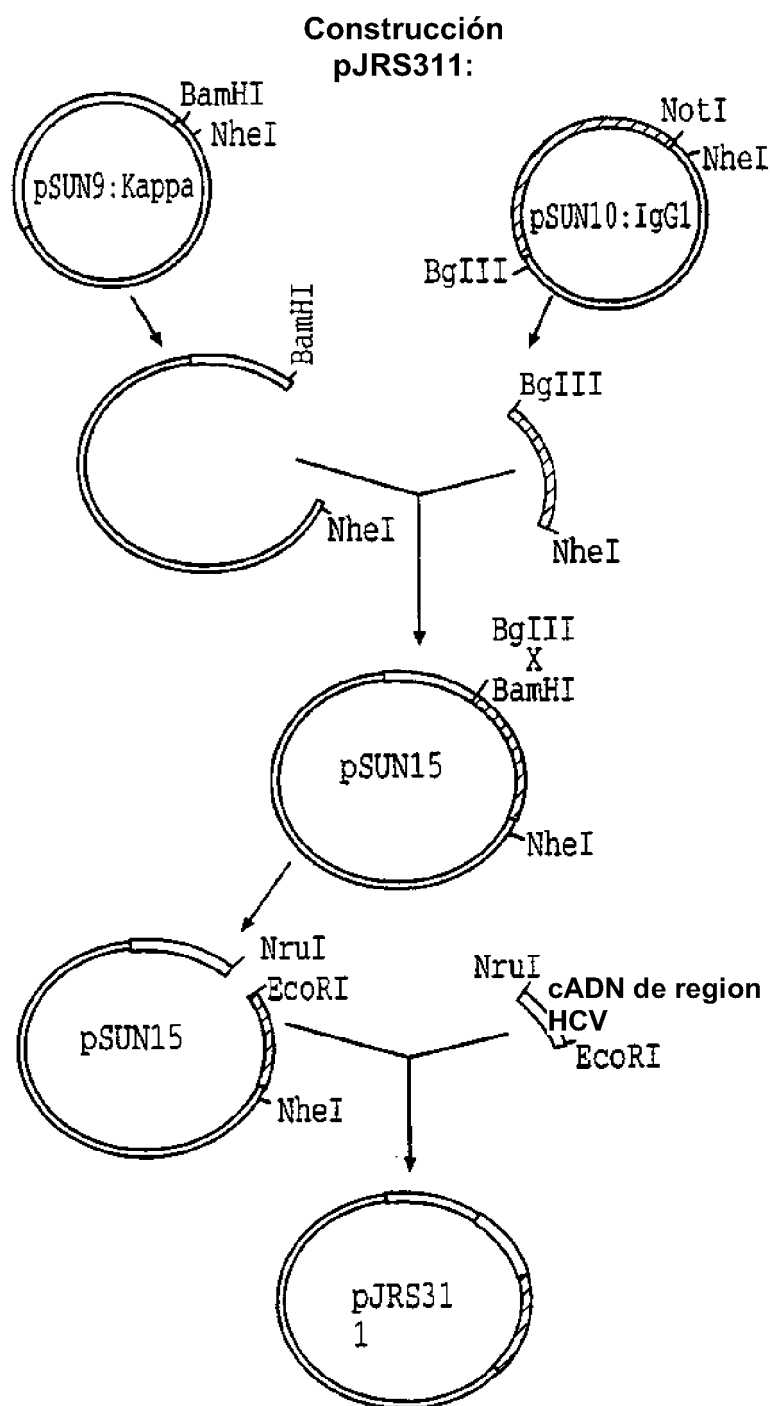


FIG. 16

**Construcción
pJRS311:**

pJRS315
construction:

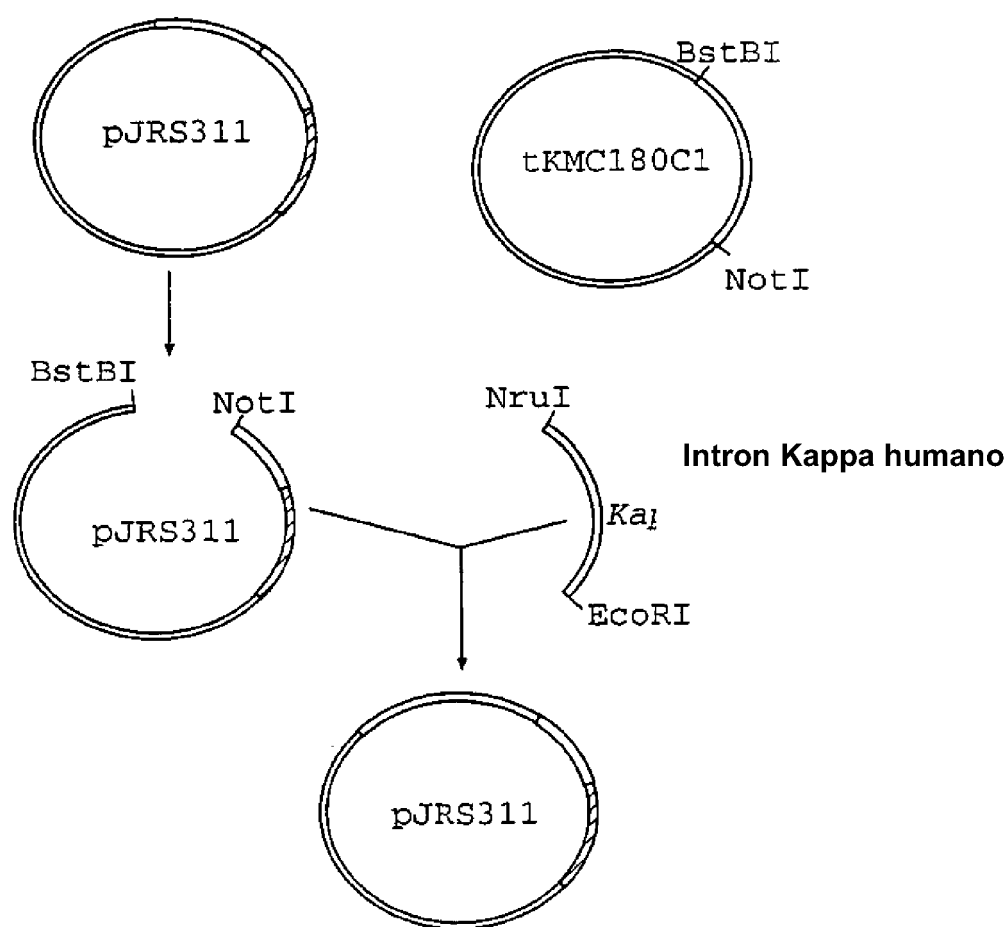


FIG. 17

ES 2 339 618 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> HENRY JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE

5 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANIZADOS QUE PROTEGEN CONTRA LA ENFERMEDAD INDUCIDA POR TOXINA SHIGA

<130> 04995.0032-00304

10

<140>

<141>

15 <160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.0

20 <210> 1

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

30 <400> 1

att tea ggc cca gcc ggc cat ggc cga rgt rma gct ksa kga gwc

45

35 <210> 2

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

45 <400> 2

atttcaggcc cagccggcca cggccgargt ycarctkcar caryc

45

50 <210> 3

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

60 <400> 3

atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt gaagtksts gartc

45

65 <210> 4

<211> 45

<212> ADN

ES 2 339 618 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
5	<400> 4	
	atttcaggcc cagccggcca tggccgargt rmagctksak gagwc	45
10	<210> 5	
	<211> 45	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
20	<400> 5	
	atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt bcarctkmar sartc	45
25	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
35	<400> 6	
	gaartavccc ttgaccaggc	20
40	<210> 7	
	<211> 35	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
50	<400> 7	
	ggaggcggcg gttctgacat tgtgmcgwcm cartc	35
55	<210> 8	
	<211> 35	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	

ES 2 339 618 T3

	<400> 8	
	cggcg gttctgatr tkygatgacb carc	35
5	<210> 9	
	<211> 35	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
15	<400> 9	
	ggaggcggcg gttctgayat ymagatgacm cagwc	35
20	<210> 10	
	<211> 35	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
30	<400> 10	
	ggaggcggcg gttctsaaat tgwktsacy cagtc	35
35	<210> 11	
	<211> 40	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
45	<400> 11	
	ttcataggcg gccgcactag tagcmcgttt cagytccarc	40
50	<210> 12	
	<211> 40	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
60	<400> 12	
	ttcataggcg gccgcactag tagcmcgttt katytccarc	40
65	<210> 13	
	<211> 23	

ES 2 339 618 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 13	
10	gcacctccag atgttaactg ctc	23
	<210> 14	
15	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 14	
25	cttgatcgcg acagctacag gtgtccactc ccaggtgcag ctgcaggag	49
	<210> 15	
30	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 15	
40	ggtatggaat tctgaggaga ctgtgagagt ggtgcc	36
	<210> 16	
45	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 16	
55	ggttctgata tcgtgatgtc ccagtctcac aaattc	36
	<210> 17	
60	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	

ES 2 339 618 T3

<400> 17

gacatattcg aaaagtgtac ttacgttca gctccagact gg

42

5

<210> 18

<211> 366

<212> ADN

10 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 18

caggtgcagc tgcaggagtc tggggctgag ctggtgaggt ctggggcctc agtgaggatg 60

15

tcttgcaagg cttctggcta cacatttacc agttacaata tgcactgggt aaaacagaca 120

cctggacagg gcctggaatg gattggatat atttatcctg gaaatgggtg tactaactac 180

20

attcagaaat ttaagggcaa ggccatattg actgcagaca catcctccag cacagcctac 240

atgcagatca gcagtctgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtac aagaagtccc 300

25

tctcactaca gtagtgaccc ctactttgac tactggggcc agggcaccac tctcacagtc 360

tcctca 366

<210> 19

30

<211> 122

<212> PRT

<213> *Shigella dysenteriae*

35

<400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

40

Ser Val Arg Met Ser Cys Asp Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

45

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ile Gln Lys Phe
50 55 60

50

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

55

Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Pro Ser His Tyr Ser Ser Asp Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

60

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

<210> 20

65

<211> 324

<212> ADN

ES 2 339 618 T3

<213> *Shigella dysenteriae*

<400> 20

```

5      gatatcgtga tgtcccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtcggaga cagggtcagc 60
      atcacctgta aggccagcca ggatgtgggt actgctgttg cctgggtatca gcagaatcca 120
10     ggacaatctc ctaaatttct gatttactgg gcateccacac ggcacactgg agtccttgat 180
      cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattaccaa tgtgcagtct 240
15     gaagacttgg cagattatct ctgtcagcaa tatagcagtt atcctctcac gttcgggtgt 300
      gggaccagtc tggagctgaa acgt·                                     324

```

<210> 21

20 <211> 108

<212> PRT

<213> *Shigella dysenteriae*

25 <400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 45

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

<400> 22

65 atttcaggcc cagccggcca tggccgargt rmagctksak gagwc

45

<210> 23

ES 2 339 618 T3

	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
10	<400> 23	
	atttcaggcc cagccggcca tggccgargt ycarctkcar caryc	45
15	<210> 24	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
25	<400> 24	
	atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt gaagctksts gartc	45
30	<210> 25	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
40	<400> 25	
	atttcaggcc cagccggcca tggccgavgt gmwgctkgtg gagwc	45
45	<210> 26	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
55	<400> 26	
	atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt bcaretkmar sartc	45
60	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	

ES 2 339 618 T3

	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 27	
5	gaartavccc ttgaccaggc	20
	<210> 28	
10	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 28	
20	gctgccaccg ccacctgmrg agacdgtgas tgarg	35
	<210> 29	
25	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 29	
35	gctgccaccg ccacctgmrg agacdgtgas mgtrg	35
	<210> 30	
40	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 30	
50	gctgccaccg ccacctgmrg agacdgtgas cagrg	35
	<210> 31	
55	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 31	
65	ggaggcggcg gttctgacat tgtgmtgwcm carte	35

ES 2 339 618 T3

	<210> 32	
	<211> 35	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
10	<400> 32	
	ggaggcggcg gttctgatr tkygatgacb carrc	35
15	<210> 33	
	<211> 35	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
25	<400> 33	
	ggaggcggcg gttctgayat ymagatgacm cagwc	35
30	<210> 34	
	<211> 35	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
40	<400> 34	
	ggaggcggcg gttctsaaat tgwktsacy cagtc	35
45	<210> 35	
	<211> 40	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
55	<400> 35	
	ttcataggcg gccgcactag tagcmcgttt cagytccarc	40
60	<210> 36	
	<211> 40	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 339 618 T3

	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
5	<400> 36	
	ttcataggcg gccgcactag tagcmcggtt katytccarc	40
10	<210> 37	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
20	<400> 37	
	atatactgcg gacagctaca ggtgtccact ccgaagtcca actgcaacag cc	52
25	<210> 38	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
35	<400> 38	
	attaatgaat tctgcggaga cggtgagagt ggtc	34
40	<210> 39	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
50	<400> 39	
	ttaaagata tcgtgctgtc acaatctcc	29
55	<210> 40	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
65	<400> 40	
	taatcgccg aaaagtgtac ttacgttca gtccagett ggtcc	45

ES 2 339 618 T3

<210> 41

<211> 339

<212> ADN

5 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 41

```

10      gacattgtgc tgcacaatc tccatcctcc ctagttgtgt cagttggaga gaaggttact 60
      atgagctgca agtctagtca gaggctttta tatagtagaa atcaaaagaa ctacttgccc 120
      tggtaaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaagtgtgta tttactgggc atctactagg 180
15      gaatctgggg tccctgatcg cctcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
      atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagttat 300
20      ccgctcacgt teggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa                      339

```

<210> 42

<211> 113

25 <212> PRT

<213> *Shigella dysenteriae*

<400> 42

```

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

```

<210> 43

<211> 357

60 <212> ADN

<213> *Shigella dysenteriae*

65

ES 2 339 618 T3

<400> 43
gaagtccaac tgcaacagcc tggacctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaaacta 60
5 tcttgcaagg cttctgggta ctctttcact gactacaaca tgaactgggt gaagcagaac 120
aatggagaga gccttgagtg gattggaaaa attgatcctt actatgggtg tcttagctac 180
10 aaccagaagt tcaaggacaa ggcacattg actgtagaca agtcttccag cacagcctac 240
15 atgcagttca agagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtac aagaggggga 300
aatagggact ggtacttcga tgtgtggggc gcagggaacca cgctcaccgt ctccgca 357
20 <210> 44
<211> 119
<212> PRT
25 <213> *Shigella dysenteriae*
<400> 44
Glu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
35 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Lys Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
40 50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
45 Met Gln Phe Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
50 Thr Arg Gly Gly Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala
55 115