



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 745**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99966644 .9**

96 Fecha de presentación : **23.12.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1141028**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos contra CTLA-4.**

30 Prioridad: **23.12.1998 US 113647 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2010

73 Titular/es: **Pfizer Inc.**
235 East 42nd Street
New York, New York 10017, US
Amgen Fremont Inc.

72 Inventor/es: **Hanson, Douglas, Charles;**
Neveu, Mark, Joseph;
Mueller, Eileen, Elliot;
Hanke, Jeffrey, Herbert;
Gilman, Steven, Christopher;
Davis, C., Geoffrey y
Corvalan, Jose, Ramon

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 humanos contra CTLA-4

5 **Fundamento del invento****1. Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU., nº de serie
10 60/113.647, presentada el 23 de Diciembre de 1998, cuya descripción se incorpora aquí en su totalidad.

2. Sumario del invento

15 De acuerdo con el presente invento, se proporcionan anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4; del inglés, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) humano. Se proporcionan secuencias nucleotídicas que codifican, y secuencias de aminoácidos que comprenden, moléculas inmunoglobulínicas de cadenas pesadas y ligeras, particularmente secuencias contiguas de cadenas pesadas y ligeras que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs; del inglés, complementarity determining regions),
20 específicamente de en FR1 y/o CDR1 a CDR3 y/o en FR4.

3. Fundamento de la tecnología

25 La regulación de la respuesta inmune de pacientes proporcionaría un tratamiento deseable de muchas enfermedades humanas que podría conducir a una especificidad de acción que se encuentra raramente mediante el uso de fármacos convencionales. Sería posible tanto la suprarregulación como la infrarregulación de respuestas del sistema inmune. Los papeles de las células T y las células B han sido ampliamente estudiados y caracterizados en relación con la regulación de la respuesta inmune. A partir de estos estudios, parece que, en muchos casos, el papel de las células T
30 es particularmente importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Las células T poseen unos sistemas muy complejos para controlar sus interacciones. En las interacciones entre células T se utilizan numerosos receptores y factores solubles para el proceso. De este modo, el efecto que una señal concreta puede ejercer sobre la respuesta inmune generalmente varía y depende de los factores, receptores y contrarreceptores concretos que están implicados en la ruta. Las rutas para las respuestas de infrarregulación son tan importantes
35 como las necesarias para la activación. La instrucción tímica que conduce a la tolerancia de las células T es un mecanismo para evitar una respuesta inmune hacia un antígeno concreto. También se conocen otros mecanismos, tal como la secreción de citocinas supresoras.

40 La activación de células T requiere no sólo la estimulación a través del receptor antigénico [receptor de células T (TCR; del inglés, T cells receptor)] sino también una señalización adicional a través de moléculas superficiales coestimulantes, tal como CD28. Los ligandos de CD28 son las proteínas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), que se expresan en células presentadoras de antígeno (APC; del inglés, antigen-presenting cells) tales como células dendríticas, células B activadas o monocitos que interaccionan con CD28 de células T o CTLA-4 para proporcionar una señal coestimulante.
45 El papel de la señalización coestimulante fue estudiado por Perrin *et al.*, Immunol. Res. 14: 189-99 (1995) en la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE). La EAE es un trastorno autoinmune provocado por células Th1 dirigidas contra antígenos de mielina, que proporciona un modelo *in vivo* para estudiar el papel de la coestimulación mediada por B7 en la inducción de una respuesta inmune patológica. Utilizando un ligando de proteína de fusión soluble para los receptores de B7, así como anticuerpos monoclonales específicos para CD80 o CD86, Perrin *et al.* demostraron
50 que la coestimulación de B7 desempeña un papel destacado a la hora de determinar el resultado de la enfermedad clínica en EAE.

La interacción entre B7 y CD28 es una de las diversas rutas de señalización coestimulantes que parecen ser suficientes para desencadenar la maduración y proliferación de células T antigénicamente específicas. La falta de coestimulación, y la concomitante insuficiencia en la producción de IL-2, evitan la subsiguiente proliferación de las células T y provocan un estado de falta de reactividad denominado "anergia". Diversos virus y tumores pueden bloquear la activación y proliferación de células T, lo que conduce a una actividad insuficiente o una falta de reactividad del sistema inmune del huésped frente a las células infectadas o transformadas. Entre las diversas alteraciones posibles de células T, la anergia puede ser al menos parcialmente responsable del fracaso del huésped a la hora de eliminar las
60 células patógenas o tumorogénicas.

El uso de la proteína B7 para mediar en la inmunidad antitumoral ha sido descrito por Chen *et al.*, Cell 71: 1093-1102 (1992), y por Townsend y Allison, Science 259: 368 (1993). Schwartz, Cell 71: 1065 (1992), ha revisado el papel de CD28, CTLA-4 y B7 en la producción de IL-2 y en inmunoterapia. Harding *et al.*, Nature 356: 607-609
65 (1994), han demostrado que la señalización mediada por CD28 coestimula células T murinas y evita la inducción de anergia en clones de células T. Véanse también las Patentes de EE.UU. números 5.434.131, 5.770.197 y 5.773.253, y las Solicitudes de Patente Internacional números WO 93/00431, WO 95/01994, WO 95/03408, WO 95/24217 y WO 95/33770.

A partir de lo precedente, resultó evidente que las células T requerían dos tipos de señales de la célula presentadora de antígeno (APC) para la activación y la subsiguiente diferenciación a la función efectora. En primer lugar, hay unas señales antigénicamente específicas generadas por interacciones entre el TCR de la célula T y péptidos que presentan moléculas del MHC en la APC. En segundo lugar, hay una señal antigénicamente independiente que es mediada por la interacción de CD28 con miembros de la familia de B7 [B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86)]. Exactamente, cuando CTLA-4 se mete en el entorno de sensibilidad inmune, es inicialmente evasiva. El CTLA-4 murino fue identificado y clonado por vez primera por Brunet *et al.*, Nature 328: 267-270 (1987), como parte de una búsqueda de moléculas que se expresan preferentemente en linfocitos T citotóxicos. El CTLA-4 humano fue identificado y clonado poco después por Dariavach *et al.*, Eur. J. Immunol. 18: 1901-1905 (1988). Las moléculas de CTLA-4 murinas y humanas poseen una homología secuencial global de aproximadamente 76% y sus dominios citoplásmicos se acercan a una identidad secuencial completa [Dariavach *et al.*, Eur. J. Immunol. 18: 1901-1905 (1988)]. El CTLA-4 es un miembro de la superfamilia inmunoglobulínica (Ig) de proteínas. La superfamilia Ig es un grupo de proteínas que comparten rasgos estructurales esenciales de un dominio variable (V) o constante (C) de moléculas Ig. Los miembros de la superfamilia Ig incluyen, pero no se limitan a, las propias inmunoglobulinas, moléculas de las clases del complejo principal de histocompatibilidad (MHC; del inglés, major histocompatibility complex) (es decir, las clases I y II del MHC), y moléculas de TCR.

En 1991, Linsley *et al.*, J. Exp. Med. 174: 561-569 (1991), propusieron que CTLA-4 era un segundo receptor de B7. Similarmente, Harper *et al.*, J. Immunol. 147: 1037-44 (1991), demostraron que las moléculas de CTLA-4 y CD28 están íntimamente relacionadas, tanto en ratón como en ser humano, en cuanto a su secuencia, expresión de mensajes, estructura génica y posición cromosómica. Véase también Balzano *et al.*, Int. J. Cancer Suppl. 7: 28-32 (1992). Surgió otra evidencia de este tipo a través de estudios funcionales. Por ejemplo, Lenschow *et al.*, Science 257: 789-792 (1992), demostraron que CTLA-4-Ig provocaba una supervivencia de larga duración de injertos de islotes pancreáticos. Freeman *et al.*, Science 262: 907-909 (1993), examinaron el papel de CTLA-4 en ratones deficientes en B7. Lenschow *et al.*, P.N.A.S. 90: 11.054-11.058 (1993), describieron un examen de los ligandos de CTLA-4. Linsley *et al.*, Science 257: 792-795 (1992), describen la inmunosupresión *in vivo* por una forma soluble de CTLA-4. Linsley *et al.*, J. Exp. Med. 176: 1595-604 (1992), prepararon anticuerpos que se unían a CTLA-4 y no presentaban reactividad cruzada con CD28, y concluyeron que CTLA-4 se coexpresa con CD28 en linfocitos T activados y regula cooperativamente la adhesión y activación de células T por B7. Kuchroo *et al.*, Cell 80: 707-18 (1995), demostraron que las moléculas coestimulantes B7-1 y B7-2 activaban diferencialmente las rutas de desarrollo de Th1/Th2. Yi-qun *et al.*, Int. Immunol 8: 37-44 (1996), demostraron que hay requisitos diferenciales para señales coestimulantes de miembros de la familia de B7 por células T de memoria, en reposo frente a las recientemente activadas, hacia antígenos de recuerdo solubles. Véase también de Boer *et al.*, Eur. J. Immunol. 23: 3120-5 (1993).

Diversos grupos propusieron interacciones receptor/ligando alternativas o distintas para CTLA-4 en comparación con CD28 e incluso propusieron un tercer complejo de B7 que era reconocido por un anticuerpo BB1. Véanse, por ejemplo, Hathcock *et al.*, Science 262: 905-7 (1993), Freeman *et al.*, Science 262: 907-9 (1993), Freeman *et al.*, J. Exp. Med. 178: 2185-92 (1993), Lenschow *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 11.054-8 (1993), Razi-Wolf *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 11.182-6 (1993), y Boussiotis *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 11.059-63 (1993). Pero véase Freeman *et al.*, J. Immunol. 161: 2708-15 (1998), quienes discutieron el hallazgo de que el anticuerpo BB1 se une a una molécula que es idéntica a la forma de CD74 de la superficie celular y, por lo tanto, el anticuerpo monoclonal (mAb; del inglés, monoclonal antibody) BB1 se une a una proteína distinta de B7-1, y que este epítipo está también presente en la proteína B7-1. De este modo, esta observación requería que los participantes reconsideraran los estudios utilizando el mAb BB1 en el análisis de la expresión y la función de CD80.

Comenzando en 1993 y culminando en 1995, los investigadores empezaron a delinear adicionalmente el papel de CTLA-4 en la estimulación de las células T. En primer lugar, mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra CTLA-4, Walunas *et al.*, Immunity 1: 405-13 (1994), proporcionaron la evidencia de que CTLA-4 puede actuar como un regulador negativo de la activación de células T. Más tarde, Waterhouse *et al.*, Science 270: 985-988 (1995), demostraron que ratones deficientes en CTLA-4 acumulaban blastos de células T con marcadores de activación suprarregulados en sus ganglios linfáticos y sus bazo. Los blastos también se infiltraban en el hígado, el corazón, el pulmón y el tejido pancreático, las cantidades de inmunoglobulina sérica estaban elevadas y sus células T proliferaban espontánea e intensamente cuando eran estimuladas a través del receptor de células T; sin embargo, eran sensibles a la muerte celular provocada por entrecruzamiento del receptor Fas y por exposición a radiación gamma. Waterhouse *et al.* concluyeron que CTLA-4 actúa como un regulador negativo de la activación de células T y es vital para el control de la homeostasis linfocitaria. En un comentario en la misma publicación, Allison y Krummel, Science 270: 932-933 (1995), discutían el trabajo de Waterhouse *et al.* como demostrativo de que CTLA-4 actúa para infrarregular la sensibilidad de las células T o tiene un papel de señalización inhibitoria en la activación y desarrollo de células T. Tivol *et al.*, Immunity 3: 541-7 (1995), también generaron ratones deficientes en CTLA-4 y demostraron que dichos ratones desarrollan rápidamente enfermedad linfoproliferativa con infiltración linfocitaria multiorgánica y destrucción tisular, con miocarditis y pancreatitis particularmente graves. Concluyeron que CTLA-4 desempeña un papel esencial en la infrarregulación de la activación de las células T y en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Además, Kummel y Allison, J. Exp. Med. 182: 459-65 (1995), también aclararon que CD28 y CTLA-4 ejercen efectos opuestos sobre la respuesta de las células T a la estimulación. Generaron un anticuerpo contra CTLA-4 e investigaron los efectos de su unión a CTLA-4 en un sistema utilizando células T muy purificadas. En su informe, mostraron que la presencia de bajos niveles de B7-2 en células T recién explantadas puede inhibir parcialmente la proliferación de células T y que ésta inhibición estaba mediada por interacciones con CTLA-4. El entrecruzamiento de CTLA-4 con el TCR y CD28 inhibe intensamente la proliferación y la secreción de IL-2 por células T. Finalmente, los resultados

mostraron que CD28 y CTLA-4 proporcionan señales opuestas que parecen ser integradas por la célula T a la hora de determinar la respuesta a un antígeno. De esta manera, concluyeron que el resultado de la estimulación del receptor antigénico de células T es regulado por señales coestimulantes de CD28 así como por señales inhibitorias derivadas de CTLA-4. Véanse también Kummel *et al.*, Int. Immunol. 8: 519-23 (1996), la Patente de EE.UU. n° 5.811.097 y la Solicitud de Patente Internacional n° WO 97/20574.

Se han llevado a cabo diversos experimentos adicionales que elucidan adicionalmente la anterior función de CTLA-4. Por ejemplo, Walunas *et al.*, J. Exp. Med. 183: 2541-50 (1996), mediante el uso de anticuerpos anti-CTLA-4, sugirieron que la señalización de CTLA-4 no regula la supervivencia celular ni la sensibilidad a IL-2 pero inhibe la producción de IL-2 dependiente de CD28. Además, Perrin *et al.*, J. Immunol. 157: 1333-6 (1996), demostraron que, en la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), anticuerpos anti-CTLA-4 exacerbaban la enfermedad y potenciaban la mortalidad. La exacerbación de la enfermedad estaba asociada con una producción aumentada de las citocinas encefalitogénicas TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2. De este modo, concluyeron que CTLA-4 regula la intensidad de la respuesta autoinmune en la EAE, atenuando la producción de citocinas inflamatorias y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Véanse también Hurwitz *et al.*, J. Neuroimmunol. 73: 57-62 (1997), y Cepero *et al.*, J. Exp. Med. 188: 199-204 (1998) (una ribozima de horquilla anti-CTLA-4 que suprime específicamente la expresión de CTLA-4 después de una transferencia génica en modelos murinos de células T).

Además, Blair *et al.*, J. Immunol. 160: 12-5 (1998), evaluaron los efectos funcionales de un conjunto de anticuerpos monoclonales (mAbs) contra CTLA-4 sobre células T CD4+ humanas en reposo. Sus resultados demostraron que algunos mAbs contra CTLA-4 podían inhibir respuestas proliferativas de células CD4+ en reposo y la transición del ciclo celular de G0 a G1. Los efectos inhibitorios de CTLA-4 eran evidentes a las 4 horas, un momento en que la expresión de CTLA-4 en la superficie celular permanecía indetectable. Sin embargo, otros mAbs contra CTLA-4 no ejercían efectos inhibitorios detectables, lo que indicaba que la unión de mAbs sólo a CTLA-4 no era suficiente para mediar en la infrarregulación de las respuestas de las células T. Es interesante resaltar que, mientras la producción de IL-2 estaba cortada, los mAbs inhibitorios anti-CTLA-4 permitían la inducción y expresión del gen bcl-X (L) de la supervivencia celular. Consistentemente con esta observación, las células permanecían viables y no se detectaba apoptosis después de la ligación de CTLA-4.

En relación con la anergia, Pérez *et al.*, Immunity 6: 411-7 (1997), demostraron que se evitaba la inducción de la anergia de células T mediante el bloqueo de CTLA-4 y concluyeron que el resultado del reconocimiento antigénico por las células T está determinado por la interacción de CD28 o CTLA-4, en las células T, con moléculas de B7. Además, Van Parijs *et al.*, J. Exp. Med. 186: 1119-28 (1997), examinaron el papel de la interleucina 12 y de coestimulantes en la anergia de células T *in vivo* y hallaron que, mediante la inhibición de la participación de CTLA-4 durante la inducción de la anergia, se bloqueaba la proliferación de células T y no se activaba la diferenciación completa de Th1. Sin embargo, las células T expuestas a un antígeno tolerogénico en presencia tanto de IL-12 como de un anticuerpo anti-CTLA-4 no resultaban anergizadas y se comportaban idénticamente a las células T que se han encontrado con un antígeno inmunogénico. Estos resultados sugerían que contribuyen dos procesos a la inducción de anergia *in vivo*: la participación de CTLA-4, que conduce a un bloqueo de la capacidad de las células T para proliferar, y la ausencia de una citocina inflamatoria prototípica, IL-12, que evita la diferenciación de las células T en células efectoras Th1. La combinación de IL-12 y un anticuerpo anti-CTLA-4 era suficiente para convertir un estímulo normalmente tolerogénico en uno inmunogénico.

En relación con infecciones, McCoy *et al.*, J. Exp. Med. 186: 183-7 (1997), demostraron que anticuerpos anti-CTLA-4 potenciaban y aceleraban en gran medida la respuesta inmune de células T a *Nippostrongylus brasiliensis*, lo que daba lugar a una profunda reducción del número de gusanos adultos y a la terminación precoz de la producción de huevos del parásito. Véase también Murphy *et al.*, J. Immunol. 161: 4153-4160 (1998) (*Leishmania donovani*).

En relación con el cáncer, Kwon *et al.*, PNAS USA 94: 8099-103 (1997), establecieron un modelo de cáncer de próstata murino singénico y examinaron dos distintas manipulaciones destinadas a provocar una respuesta anticáncer de próstata por medio de una coestimulación potenciada de células T: (i) provisión de una coestimulación directa por células de cáncer de próstata transducidas para que expresaran el ligando de B7-1, y (ii) bloqueo *in vivo* de CTLA-4 de células T, mediado por anticuerpos, que evita la infrarregulación de las células T. Se demostró que el bloqueo *in vivo* de CTLA-4, mediado por anticuerpos, potenciaba respuestas inmunes anticáncer de próstata. Además, Yang *et al.*, Cancer Res. 57: 4036-41 (1997), investigaron si el bloqueo de la función de CTLA-4 conduce a la potenciación de respuestas antitumorales de células T en diversas fases de crecimiento tumoral. Basándose en los resultados *in vitro* e *in vivo*, hallaron que el bloqueo de CTLA-4 en los individuos portadores de tumor potenciaba la capacidad para generar respuestas antitumorales de células T, pero, en su modelo, la expresión de dicho efecto potenciador estaba restringida a las fases precoces del crecimiento tumoral. Además, Hurwitz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 10.067-71 (1998), investigaron la generación de una respuesta antitumoral mediada por células T, que depende de la participación del receptor de células T, por el complejo principal de histocompatibilidad/antígeno así como por la ligación de CD28 por B7. Ciertos tumores, tal como el carcinoma mamario SM1, resultaron refractarios a la inmunoterapia con anti-CTLA-4. De este modo, mediante el uso de una combinación del bloqueo de CTLA-4 y una vacuna que consistía en células SM1 que expresaban el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, se observó la regresión de tumores SM1 parentales a pesar de la ineficacia de cualquier de los dos tratamientos solo. Esta terapia de combinación daba lugar a una inmunidad de larga duración hacia SM1 y dependía de células T tanto CD4(+) como CD8 (+). Los hallazgos sugerían que el bloqueo de CTLA-4 actúa a nivel de una célula presentadora de antígeno derivada del huesped.

En relación con la diabetes, Luhder *et al.*, J. Exp. Med. 187: 427-32 (1998), inyectaron un mAb anti-CTLA-4 a un modelo de diabetes en ratón transgénico para TCR, en diferentes fases de la enfermedad. Hallaron que la participación de CTLA-4 en el momento en que se activan por vez primera células T potencialmente diabetogénicas es un proceso esencial; si se permite la participación, se produce la invasión de los islotes, aunque permanece bastante inocua durante meses. En caso contrario, la insulinitis es mucho más agresiva y se origina rápidamente una diabetes.

En relación con una inmunización por vacuna, Horspool *et al.*, J. Immunol. 160: 2706-14 (1998), hallaron que un mAb anti-CTLA-4 intacto, pero no los fragmentos Fab, suprimía la respuesta humoral primaria a pCIA/beta gal sin afectar a las respuestas de recuerdo, lo que indicaba que la activación de CTLA-4 inhibía la producción de Ab pero no la estimulación primaria de células T. El bloqueo de los ligandos de CD28 y CTLA-4, CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), reveló una función distinta y no solapante. El bloqueo de CD80 en la inmunización inicial suprimía completamente las respuestas primarias y secundarias de Ab, mientras que el bloqueo de CD86 suprimía las respuestas primarias pero no las secundarias. El bloqueo simultáneo de CD80 y CD86 era menos eficaz en cuanto a suprimir las respuestas de Ab que el de cualquiera de los dos solo. La potenciación de la coestimulación por medio de la coinyección de plásmidos que expresaban B7 aumentaba las respuestas de CTL pero no las respuestas de Ab, y sin evidencia de sesgo Th1 a Th2. Estos hallazgos sugieren papeles complejos y distintos para CD28, CTLA-4, CD80 y CD86 en la coestimulación de células T después de una vacunación con ácido nucleico.

En relación con el rechazo de aloinjertos, Markees *et al.*, J. Clin. Invest. 101: 2446-55 (1998), hallaron en un modelo de rechazo de aloinjertos de piel en ratón que la aceptación dependía inicialmente de la presencia de IFN-gamma, CTLA-4 y células T CD4(+). La adición de un mAb anti-CTLA-4 o anti-IFN-gamma al protocolo se asoció con un inmediato rechazo de injertos, mientras que un mAb anti-IL-4 no produjo efecto alguno.

Con respecto al papel de CTLA-4 en relación con CD28, Fallarino *et al.*, J. Exp. Med. 188: 205-10 (1998), generaron ratones deficientes en CD28 o de tipo silvestre para CD28/deficientes en el gen 2 activador de la recombinasa/transgénicos para TCR que fueron inmunizados con un tumor que expresaba antígeno. Las células T primariamente estimuladas de ambos tipos de ratones producían citocinas y proliferaban en respuesta a células estimuladoras que carecían de expresión de B7. Sin embargo, mientras que la respuesta de las células T CD28+/+ resultaba aumentada por la coestimulación con B7-1, la respuesta de las células T CD28-/- resultaba fuertemente inhibida. Esta inhibición era invertida mediante un anticuerpo monoclonal contra B7-1 o CTLA-4. De esta manera, CTLA-4 puede inhibir potentemente la activación de las células T en ausencia de CD28, lo que indica que el antagonismo de una señal mediada por TCR es suficiente para explicar el efecto inhibitorio de CTLA-4. Además, Lin *et al.*, Exp. Med. 188: 199-204 (1998), estudiaron el rechazo de aloinjertos de corazón en ratones deficientes en CD28. Se trasplantaron corazones H-2(q) a ratones alógenos de tipo silvestre o deficientes en CD28 [H-2(b)]. El rechazo del injerto resultó retrasado en los ratones deficientes en CD28 en comparación con los de tipo silvestre. El tratamiento de los ratones receptores de tipo silvestre con CTLA-4- inmunoglobulina (Ig), o con mAbs anti-B7-1 más anti-B7-2 prolongaba significativamente la supervivencia de los aloinjertos. Por contraste, el tratamiento de los ratones deficientes en CD28 con CTLA-4-Ig, mAbs anti-B7-1 más anti-B7-2, o un mAb anti-CTLA-4 bloqueante inducía la aceleración del rechazo de los aloinjertos. Esta velocidad aumentada del rechazo de los injertos se asoció con una infiltración de células mononucleares más intensa y con unos niveles aumentados de transcritos de IFN-gamma e IL-6 en los corazones de donante de los ratones de tipo silvestre no tratados y de los ratones deficientes en CD28 tratados con CTLA-4-Ig o mAb anti-CTLA-4. De este modo, el papel regulador negativo de CTLA-4 se extiende más allá de su potencial capacidad para prevenir la activación de CD28 a través de la competición de los ligandos. Incluso en ausencia de CD28, CTLA-4 desempeña un papel inhibitorio en la regulación del rechazo de aloinjertos.

Además, se ha investigado una caracterización más de la expresión de CTLA-4. Por ejemplo, Alegre *et al.*, J. Immunol. 157: 4762-70 (1996), propusieron que el CTLA-4 superficial es rápidamente internalizado, lo que puede explicar los bajos niveles de expresión generalmente detectados en la superficie celular. Concluyeron que tanto CD2g como IL-2 desempeñan papeles importantes en la suprarregulación de la expresión de CTLA-4. Además, parece que la acumulación de CTLA-4 en la superficie celular es principalmente regulada por su rápida endocitosis. Además, Castan *et al.*, Immunology 90: 265-71 (1997), basándose en análisis inmunohistológicos *in situ* de la expresión de CTLA-4, sugirieron que células T de centros germinales, que eran positivas para CTLA-4, podrían ser importantes para la regulación inmune.

En consecuencia, a la vista del amplio y esencial papel que parece poseer CTLA-4 en la sensibilidad inmune, sería deseable generar anticuerpos hacia CTLA-4 que pudieran ser eficazmente utilizados en inmunoterapia. Además, sería deseable generar anticuerpos contra CTLA-4 que pudieran ser utilizados en enfermedades crónicas en que se requieren administraciones repetidas de los anticuerpos.

Breve descripción de las figuras de los dibujos

La Figura 1 proporciona una serie de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las moléculas inmunoglobulínicas de cadenas pesadas y cadenas ligeras kappa 4.1.1 (Figura 1A), 4.8.1 (Figura 1B), 4.14.3 (Figura 1C), 6.1.1 (Figura 1D), 3.1.1 (Figura 1E), 4.10.2 (Figura 1F), 2.1.3 (Figura 1G), 4.13.1 (Figura 1H), 11.2.1 (Figura 1I, de acuerdo con el invento), 11.6.1 (Figura 1J, de acuerdo con el invento), 11.7.1 (Figura 1K), 12.3.1.1 (Figura 1L) y 12.9.1.1 (Figura 1M).

ES 2 340 745 T3

La Figura 2 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas de los clones 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal DP-50 (3-33). Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de DP-50 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos en forma sombreada.

La Figura 3 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena pesada del clon 2.1.3 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal DP-65 (4-31). Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de DP-65 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 4 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras kappa de los clones 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 4.10.2 y 4.13.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A27. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A27 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada. Las aparentes delecciones en los CDR1s de los clones 4.8.1, 4.14.3 y 6.1.1 se indican con "0s".

La Figura 5 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras kappa de los clones 3.1.1, 11.2.1, 11.6.1 y 11.7.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal 012. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de 012 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 6 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 2.1.3 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A10/A26. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A10/A26 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 7 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 12.3.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A17. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A17 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 8 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 12.9.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A3/A19. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A3/A19 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 9 proporciona un resumen de secuencias de aminoácidos N-terminales generadas mediante la secuenciación proteica directa de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos.

La Figura 10 proporciona cierta información caracterizadora adicional acerca de ciertos anticuerpos. En la Figura 10A, se resumen datos relacionados con los clones 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.14.3 y 6.1.1. Se proporcionan datos relacionados con concentración, enfoque isoeléctrico (IEF; del inglés, isoelectric focusing), electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE; del inglés, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC; del inglés, size exclusion chromatography), cromatografía en fase líquida/espectroscopia de masas (LCMS; del inglés, liquid chromatography/mass spectroscopy), espectroscopia de masas (MALDI) y secuencias N-terminales de cadenas ligeras. Se proporciona información detallada adicional relacionada con IEF en la Figura 10B; relacionada con SDS-PAGE en la 10C; y relacionada con SEC del anticuerpo 4.1.1 en la 10D.

La Figura 11 muestra la expresión de B7-1 y B7-2 en células Raji utilizando mAbs anti-CD80-PE y anti-CD86-PE.

La Figura 12 muestra la potenciación, dependiente de la concentración, de la producción de IL-2 en el ensayo con blastos de células T/Raji, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 (BNI3, 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1).

La Figura 13 muestra la potenciación, dependiente de la concentración, de la producción de IFN- γ en el ensayo con blastos de células T/Raji, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 (BNI3, 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1) (mismas células T de donante).

La Figura 14 muestra la potenciación media de la producción de IL-2 en células T de 6 donantes, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 en el ensayo con blastos de células T/Raji.

La Figura 15 muestra la potenciación media de la producción de IFN- γ en células T de 6 donantes, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 en el ensayo con blastos de células T/Raji.

La Figura 16 muestra la potenciación de la producción de IL-2 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs; del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*) humanas de 5 donantes, inducida por mAbs bloqueantes anti-CTLA-4 según se mide a las 72 horas después de una estimulación con SEA.

5 La Figura 17 muestra la potenciación de la producción de IL-2 en sangre completa de 3 donantes, inducida por mAbs bloqueantes anti-CTLA-4 según se mide a las 72 y 96 horas después de una estimulación con SEA.

La Figura 18 muestra la inhibición del crecimiento tumoral con un anticuerpo anti-CTLA-4 murino en un modelo de tumor de fibrosarcoma murino.

10 La Figura 19 muestra la potenciación de la producción de IL-2, inducida por anticuerpos anti-CTLA-4 (4.1.1 y 11.2.1) en unos ensayos de 72 horas con blastos T/Raji y superantígeno (sangre completa y células mononucleares de sangre periférica de 6 donantes).

15 La Figura 20 muestra la potenciación, dependiente de la dosis, de la producción de IL-2 inducida por anticuerpos anti-CTLA-4 (4.1.1 y 11.2.1) en un ensayo de 72 horas con blastos T/Raji

La Figura 21 muestra la potenciación, dependiente de la dosis, de la producción de IL-2 inducida por anticuerpos anti-CTLA-4 (4.1.1 y 11.2.1) en un ensayo de 72 horas con sangre completa y superantígeno, estimulado con 100 ng/ml de superantígeno.

La Figura 22 proporciona una serie de secuencias adicionales de nucleótidos y aminoácidos de las siguientes cadenas de anticuerpo anti-CTLA-4: cadena pesada de 4.1.1 de longitud completa [cDNA 22(a), DNA genómico 22 (b) y aminoácidos 22(c)], cadena pesada de 4.1.1 aglicosilada de longitud completa [cDNA 22(d) y aminoácidos 22 (e)], cadena ligera de 4.1.1 [cDNA 22(f) y aminoácidos 22(g)], cadena pesada de 4.8.1 de longitud completa [cDNA 22(h) y aminoácidos 22(i)], cadena ligera de 4.8.1 [cDNA 22(j) y aminoácidos 22(k)], cadena pesada de 6.1.1 de longitud completa [cDNA 22(l) y aminoácidos 22(m)], cadena ligera de 6.1.1 [cDNA 22(n) y aminoácidos 22(o)], cadena pesada de 11.2.1 de longitud completa [cDNA 22(p) y aminoácidos 22(q)], y cadena ligera de 11.2.1 [cDNA 22(r) y aminoácidos 22(s)].

Sumario del invento

De acuerdo con el presente invento, se proporciona un anticuerpo que es capaz de unirse a CTLA-4, que es adicionalmente caracterizado en las reivindicaciones.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

De acuerdo con el presente invento, se proporcionan anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra CTLA-4 humano. Se proporcionan secuencias nucleotídicas que codifican, y secuencias de aminoácidos que comprenden, moléculas inmunoglobulínicas de cadenas pesadas y ligeras, particularmente secuencias que corresponden a secuencias contiguas de cadenas pesadas y ligeras de FR1 y CDR1 a CDR3 y FR4. También se proporcionan hibridomas que expresan dichas moléculas inmunoglobulínicas y dichos anticuerpos monoclonales.

Definiciones

A menos que aquí se defina otra cosa, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con el presente invento tendrán los significados que son comúnmente entendidos por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera otra cosa, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivos celular y tisular, biología molecular, y química e hibridación de proteínas y oligonucleótidos o polinucleótidos aquí descritas son aquéllas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas estándares para DNA recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación y lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes o como se desarrollan comúnmente en la técnica o como aquí se describen. Las técnicas y los procedimientos precedentes se llevan generalmente a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y del modo descrito en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" [2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)], que se incorpora aquí por referencia. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica aquí descritas son aquéllas bien conocidas y comúnmente utilizadas en este campo técnico. Se utilizan técnicas estándares para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y distribución farmacéuticas, y tratamiento de pacientes.

Se entenderá que, a menos que se indique otra cosa, los términos y expresiones siguientes, como se utilizan de acuerdo con la presente descripción, tienen los significados siguientes:

La expresión “polinucleótido aislado”, como aquí se utiliza, significa un polinucleótido de origen genómico, cDNA o sintético, o alguna combinación de los mismos; en virtud de su origen, el “polinucleótido aislado” (1) no está asociado con todo, o una porción de, un polinucleótido en el cual el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza, (2) está operativamente enlazado con un polinucleótido con el que no está enlazado en la naturaleza, o (3) no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

La expresión “proteína aislada”, a la que aquí se hace referencia, significa una proteína de cDNA, RNA recombinante u origen sintético, o alguna combinación de los mismos; en virtud de su origen o de la fuente de procedencia, la “proteína aislada” (1) no está asociada con proteínas halladas en la naturaleza, (2) está exenta de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, exenta de proteínas murinas, (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no se encuentra en la naturaleza.

El término “polipéptido”, como se utiliza aquí como término genérico, se refiere a una proteína nativa, fragmentos, o compuestos análogos de una secuencia polipeptídica. Por lo tanto, proteína nativa, fragmentos y compuestos análogos son especies del género polipéptido. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con el invento comprenden las moléculas inmunoglobulínicas de cadenas pesadas humanas y las moléculas inmunoglobulínicas de cadenas ligeras kappa humanas representadas en la Figura 1, así como las moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas inmunoglobulínicas de cadenas pesadas con moléculas inmunoglobulínicas de cadenas ligeras, tales como las moléculas inmunoglobulínicas de cadenas ligeras kappa, y viceversa, así como fragmentos y compuestos análogos de las mismas.

La expresión “presente en la naturaleza”, como aquí se utiliza al aplicarse a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede hallarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus), que puede aislarse de una fuente de la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificada por el hombre en el laboratorio u otro lado está presente en la naturaleza.

La expresión “operativamente enlazado”, como aquí se utiliza, se refiere a las posiciones de componentes así descritas que están en una relación que les permite actuar del modo previsto. Una secuencia de control “operativamente enlazada” con una secuencia de codificación está ligada de tal modo que la expresión de la secuencia de codificación se realiza bajo unas condiciones compatibles con la secuencia de control.

La expresión “secuencia de control”, como aquí se usa, se refiere a secuencias polinucleotídicas que son necesarias para que se efectúen la expresión y el procesamiento de las secuencias de codificación con las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión ribosómica y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente promotores y una secuencia de terminación de la transcripción. Se pretende que la expresión “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, tales como, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.

El término “polinucleótido”, al que aquí se hace referencia, significa una forma polímera de nucleótido con al menos 10 bases de longitud, sea un ribonucleótido o un desoxinucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de DNA de cadenas sencilla y doble.

El término “oligonucleótido”, al que aquí se hace referencia, incluye nucleótidos presentes en la naturaleza y nucleótidos modificados enlazados entre sí por enlaces oligonucleotídicos presentes en la naturaleza y no presentes en la naturaleza. Los oligonucleótidos son un subconjunto polinucleotídico que comprende generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases y, muy preferiblemente, una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 bases. Los oligonucleótidos son normalmente de cadena sencilla, por ejemplo, para sondas, aunque pueden ser de cadena doble, por ejemplo, para uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

La expresión “nucleótidos presentes en la naturaleza”, a la que aquí se hace referencia, incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión “nucleótidos modificados”, a la que aquí se hace referencia, incluye nucleótidos con grupos azúcar y similares modificados o sustituidos: La expresión “enlaces oligonucleotídicos”, a la que aquí se hace referencia, incluye enlaces de oligonucleótido tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoaniladato, fosforoamidato y similares. Véanse, por ejemplo, LaPlanche *et al.*, Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984); Stein *et al.*, Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988); Zon *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon *et al.*, “Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach”, páginas 87-108 [redactado por F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (1991)]; Stec *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.151.510; y Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90: 543 (1990), cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia. Un oligonucleótido puede incluir, si se desea, una etiqueta para detección.

La expresión “hibridarse selectivamente”, a la que aquí se hace referencia, significa unirse detectable y específicamente. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con el invento se hibridan selectivamente con cadenas de ácidos nucleicos bajo unas condiciones de hibridación y lavado que minimizan unas cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos inespecíficos. Se pueden utilizar condiciones de alto

rigor para alcanzar unas condiciones de hibridación selectivas, como se conocen en la técnica y aquí se discuten. Generalmente, la homología de secuencias de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos del invento y una secuencia de ácido nucleico de interés será al menos 80% y, más típicamente, con homologías preferiblemente crecientes de al menos 85%, 90%, 95%, 99% y 100%. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si hay una identidad parcial o completa entre ellas. Por ejemplo, una homología de 85% significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias son alineadas para un máximo apareamiento. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que se aparean) para maximizar el apareamiento; se prefieren longitudes de hueco de 5 o menos, siendo más preferidas las longitudes de 2 o menos. Alternativa y preferiblemente, dos secuencias proteicas (o secuencias polipeptídicas derivadas de ellas, de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, como aquí se usa este término, si tienen una calificación de alineación superior a 5 (en unidades de desviación estándar) al usar el programa ALIGN con la matriz de datos de mutaciones y una penalización por hueco de 6 o más. Véanse M. O. Dayhoff en "Atlas of Protein Sequence and Structure", páginas 101-110 [Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)], y el Suplemento 2 de este volumen, páginas 1-10. Las dos secuencias o partes de ellas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos tienen una identidad mayor o igual a 50% cuando se alinean óptimamente usando el programa ALIGN. La expresión "corresponde a" se usa aquí para significar que una secuencia polinucleotídica es homóloga (es decir, es idéntica, no exactamente relacionada evolutivamente) a toda, o una porción de, una secuencia polinucleotídica de referencia, o que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia. Por contraste, la expresión "complementaria de" se usa aquí para significar que la secuencia complementaria es homóloga a toda, o una porción de, una secuencia polinucleotídica de referencia. Como ilustración, la secuencia nucleotídica "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria de una secuencia de referencia "GTATA".

Se usan los términos siguientes para describir las relaciones secuenciales entre dos o más secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencias", "porcentaje de identidad de secuencias" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, tal como, por ejemplo, un segmento de una secuencia de cDNA o génica de longitud completa dada en una enumeración de secuencias, o puede comprender una secuencia de cDNA o génica completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos, frecuentemente una longitud de al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos, y a menudo una longitud de al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos. Puesto que cada uno de dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos (1) puede comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia polinucleotídica o de aminoácidos completa) que sea similar entre las dos moléculas, y (2) puede comprender además una secuencia que sea divergente entre los dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas se llevan típicamente a cabo comparando secuencias de las dos moléculas sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud secuencial. Una "ventana de comparación", como aquí se utiliza, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones nucleotídicas contiguas o 6 aminoácidos en el que se puede comparar una secuencia polinucleotídica o una secuencia de aminoácidos con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos y en el que la porción de la secuencia polinucleotídica de la ventana de comparación puede comprender adiciones, supresiones y similares (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede ser llevada a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo para alineación de homologías de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos [GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA de los paquetes de software de Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, EE.UU.), Geneworks o MacVector], o por inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, la que da lugar al mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

La expresión "identidad de secuencias" significa que dos secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos son idénticas (es decir, sobre una base de nucleótido-por-nucleótido o de resto-por-resto) sobre la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencias" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en que se encuentra el base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I) o el resto idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias. La expresión "identidad sustancial", como aquí se utiliza, significa una característica de una secuencia polinucleotídica o de aminoácidos en que el polinucleótido o los aminoácidos comprenden una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 85 por ciento, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 90 a 95 por ciento, más normalmente una identidad de secuencia de al menos 99 por ciento, en comparación con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de al menos 18 posiciones nucleotídicas (6 aminoácidos), frecuentemente sobre una ventana de al menos 24-48 posiciones nucleotídicas (8-16 aminoácidos), en que el porcentaje de identidad de secuencias se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia, que puede incluir supresiones o adiciones que totalicen el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia, sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Como aquí se usan, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen la utilización convencional. Véase "Immunology - A Synthesis [2ª edición, redactado por E. S. Golub y D. R. Gren, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EE.UU. (1991)], que se incorpora aquí por referencia. Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos artificiales tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquil-aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales pueden ser también componentes adecuados para los polipéptidos del presente invento. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación polipeptídica aquí usada, la dirección de la izquierda es la dirección aminoterminal y la dirección de la derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con la utilización y la convención estándares.

Similarmente, a menos que se especifique otra cosa, el extremo de la izquierda de la secuencias polinucleotídicas de cadena sencilla es el extremo 5'; a la dirección de la izquierda de las secuencias polinucleotídicas de doble cadena se hace referencia como la dirección 5'. A la dirección de la adición 5' a 3' de los transcritos de RNA nacientes se hace referencia como la dirección de transcripción; a las regiones secuenciales de la cadena de DNA que tienen la misma secuencia que el RNA y que están en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de RNA se hace referencia como "secuencias cadena arriba"; a las regiones secuenciales de la cadena de DNA que tienen la misma secuencia que el RNA y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de RNA se hace referencia como "secuencias cadena abajo".

Como se aplica a polipéptidos, la expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante el programa GAP o BESTFIT usando los pesos de hueco por omisión, comparten una identidad de secuencias de al menos 80 por ciento, preferiblemente una identidad de secuencias de al menos 90 por ciento, más preferiblemente una identidad de secuencias de al menos 95 por ciento, y muy preferiblemente una identidad de secuencias de al menos 99 por ciento. Preferiblemente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren por sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es el formado por glicocola, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxílicas es el formado por serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es el formado por asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es el formado por fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es el formado por lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es el formado por cisteína y metionina. Los grupos preferidos para una sustitución conservativa de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspartico y asparagina-glutamina.

Como aquí se discute, se contempla que el presente invento abarque variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o las moléculas inmunoglobulínicas, con tal de que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos un 90%. En particular, se contemplan sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados en cuanto a sus cadenas laterales. Los aminoácidos genéticamente codificados se dividen generalmente en familias: (1) ácidos = aspartato y glutamato; (2) básicos = lisina, arginina e histidina; (3) no polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano; y (4) polares no cargados = glicocola, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. Son familias más preferidas: serina y treonina son una familia alifática-hidroxílica; asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y fenilalanina, triptófano y tirosina son una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o una valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o un aminoácido similar por un aminoácido estructuralmente relacionado, no ejerza un efecto importante sobre la unión ni las propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no afecta a un aminoácido de un sitio de armazón. Se puede determinar fácilmente si un cambio de aminoácido da lugar a un péptido funcional analizando la actividad específica del derivado polipeptídico. Aquí se describen ensayos con detalle. Quienes tienen una experiencia normal en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos de anticuerpos o moléculas inmunoglobulínicas. Los extremos amínicos y carboxílicos preferidos de los fragmentos o compuestos análogos se encuentran cerca de los bordes de dominios funcionales. Se pueden identificar dominios estructurales y funcionales por comparación de los datos de las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferiblemente, se utilizan métodos de comparación informáticos para identificar motivos de secuencias o previstos dominios de conformación proteica que se encuentran en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias proteínicas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida [Bowie *et al.*, Science 253: 164 (1991)]. De este modo, los ejemplos precedentes demuestran que quienes tienen experiencia en la técnica pueden reconocer motivos secuenciales y conformaciones estructurales que se pueden utilizar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con el invento.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad ligante para formar complejos proteínicos, (4) alteran las afinidades ligantes y (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos compuestos análogos. Los compuestos análogos pueden incluir diversas mutéfnas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica presente en la naturaleza. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples

(preferiblemente sustituciones conservativas de aminoácidos) en la secuencia presente en la naturaleza [preferiblemente en la porción del polipéptido que está fuera del(de los) dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares]. Una sustitución de aminoácido conservativa no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debería tender a romper una hélice que se encuentra en la secuencia parental ni a alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia parental). En "Proteins, Structures and Molecular Principles" [redactado por Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1984)], "Introduction to Protein Structure" [redactado por C. Branden y J. Tooze, Garland Publishing, New York, EE.UU. (1991)], y Thornton *et al.*, Nature 354: 105 (1.991), que se incorporan aquí por referencia, se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en la técnica.

La expresión "fragmento polipeptídico", como aquí se utiliza, se refiere a un polipéptido que tiene una supresión amino-terminal y/o carboxi-terminal pero cuya restante secuencia de aminoácidos es idéntica a las correspondientes posiciones de la secuencia presente en la naturaleza y deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de DNA de longitud completa. Los fragmentos tienen típicamente una longitud de al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos, preferiblemente una longitud de al menos 14 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de al menos 20 aminoácidos, normalmente una longitud de al menos 50 aminoácidos, y aún más preferiblemente una longitud de al menos 70 aminoácidos.

"Anticuerpo" y "péptido(s) de anticuerpo" se refieren a un anticuerpo intacto o un fragmento ligante del mismo que compite con el anticuerpo intacto por una unión específica. Se producen fragmentos ligantes mediante técnicas de RNA recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos ligantes incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos de cadena única. Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene idéntico cada uno de sus sitios ligantes. Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un receptor a un contrarreceptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido al contrarreceptor en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60% u 80%, y más normalmente en más de aproximadamente 85% (según se mide en un ensayo de unión competitiva *in vitro*).

El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente con una inmunoglobulina o un receptor de célula T. Los determinantes epitópicos consisten normalmente en agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen normalmente unas características estructurales tridimensionales específicas así como unas características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente con un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, y muy preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$.

El término "agente" se utiliza aquí para significar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

Cómo se utilizan aquí, los términos "etiqueta" y "etiquetado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable mediante, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la fijación de grupos biotínico a un polipéptido que pueden ser detectados mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática, que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o el marcador puede ser también terapéutico. En la técnica se conocen, y se pueden utilizar, diversos métodos para marcación de polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionucleidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I y ¹³¹I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina y lantánido-fósforo), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa y fosfatasa alcalina), etiquetas quimioluminiscentes, grupos biotínico, y epítipos polipeptídicos predeterminados, reconocidos por un informador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios ligantes para anticuerpos secundarios, dominios ligantes de metales, y etiquetas epitópicas). En algunas realizaciones, las etiquetas se fijan mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir un posible impedimento estérico.

Como aquí se utiliza, la expresión "agente farmacéutico o fármaco" se refiere a un compuesto o composición química capaz de provocar un deseado efecto terapéutico cuando se administra apropiadamente a un paciente. Otros términos químicos presentes se usan de acuerdo con la utilización convencional en la técnica, como se ejemplifica en "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms" [redactado por S. Parker, McGraw-Hill, San Francisco (1985)], incorporado aquí por referencia.

La expresión "agente antineoplásico" se usa aquí para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir el desarrollo o progreso de una neoplasia en un ser humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa) tal como carcinoma, sarcoma, linfoma o leucemia. La inhibición de metástasis es frecuentemente una propiedad de los agentes antineoplásicos.

Como aquí se utiliza, "sustancialmente puro" significa una especie objetivo que es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar, es más abundante en la composición que cualquier otra especie individual), y, preferiblemente, una fracción sustancialmente purificada es una composición en que la especie objetivo comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el

85%, 90%, 95% y 99%. Muy preferiblemente, la especie objetivo se purifica hasta una homogeneidad esencial (no se pueden detectar especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales), en que la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

- 5 El término “paciente” incluye sujetos humanos y veterinarios.

Estructura de los anticuerpos

- 10 Se sabe que la unidad estructural básica de un anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, teniendo cada pareja una cadena “ligera” (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 1,00 a 110 o más aminoácidos, responsable principalmente del reconocimiento antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante, responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican en cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en mu, delta, gamma, alfa y épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. En las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo además las cadenas pesadas una región “D” de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Véase, en general, *Fundamental Immunology*, Capítulo 7 [redactado por W. Paul, 2ª edición, Raven Press, New York, EE.UU. (1989); incorporado por referencia en su totalidad para todos los fines]. Las regiones variables de cada pareja de cadenas ligera/pesada forman el sitio ligante del anticuerpo.

- 25 Por lo tanto, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios ligantes. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios ligantes son iguales.

- 30 Todas las cadenas presentan la misma estructura general de regiones de armazón (FR; del inglés, *framework regions*) relativamente conservadas, unidas por tres regiones hipervariables también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada pareja están alineadas por las regiones de armazón, lo que permite la unión a un epítipo específico. Del extremo N al extremo C, ambas cadenas, la ligera y la pesada, comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, “*Sequences of Proteins of Immunological Interest*” [National Institutes of Bethesda, Maryland, EE.UU. (1987 y 1991)], o Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987), y Chothia *et al.*, *Nature* 342: 878-883 (1989).

- 35 Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos parejas diferentes de cadenas pesada/ligera y dos diferentes sitios ligantes. Se pueden producir anticuerpos biespecíficos mediante una diversidad de métodos, incluyendo la fusión de hibridomas y el enlace de fragmentos Fab’. Véanse, por ejemplo, Songvilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), y Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992). Además, se pueden formar anticuerpos biespecíficos como “diacuerpos” [Holliger *et al.*, “Diabodies: Small bivalent and bispecific antibody fragments” *PNAS USA* 90: 6444-6448 (1993)] o “Janusins” [Traunecker *et al.*, “Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells”, *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991), y Traunecker *et al.*, “Janusin: New molecular design for bispecific reagents”, *Int. J. Cancer, Supl.* 7: 51-52 (1992)]. La producción de anticuerpos biespecíficos puede ser un proceso relativamente laborioso en comparación con la producción de anticuerpos convencionales, y los rendimientos y los grados de pureza son generalmente menores para los anticuerpos biespecíficos. No existen anticuerpos biespecíficos en forma de fragmentos que tengan un solo sitio ligante (por ejemplo, Fab, Fab’ y Fv).

Anticuerpos humanos y humanización de anticuerpos

- 50 Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes murinas o de rata. La presencia de dichas proteínas de origen murino o de rata puede conducir al rápido aclaramiento de los anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo por el paciente. Con objeto de evitar la utilización de anticuerpos de origen murino o de rata, se ha postulado que se pueden desarrollar anticuerpos humanizados o generar anticuerpos totalmente humanos mediante la introducción de una función de anticuerpo humano en un roedor para que el roedor produzca anticuerpos que tengan una secuencia totalmente humana.

Anticuerpos humanos

- 60 La capacidad para clonar y reconstruir loci humanos con un tamaño de megabases en YACs y para introducirlos en la línea germinal de un ratón proporciona un planteamiento potente para elucidar los componentes funcionales de loci muy grandes o toscamente mapeados así como para generar modelos útiles de enfermedades humanas. Además, la utilización de dicha tecnología para la sustitución de loci de ratón por sus equivalentes humanos podría proporcionar perspectivas únicas en la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su implicación en la inducción y el progreso de enfermedades.

Una importante aplicación práctica de dicha estrategia es la “humanización” del sistema inmune humoral del ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en que se han inactivado los genes de Ig endógenos ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos que subyacen bajo la expresión y el ensamblaje programados de anticuerpos así como su papel en el desarrollo de células B. Además, dicha estrategia podría proporcionar una

5 fuente ideal para la producción de anticuerpos monoclonales (mAbs) totalmente humanos, un hito importante hacia el cumplimiento de la promesa de la terapia con anticuerpos en enfermedades humanas. Se espera que los anticuerpos totalmente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a los mAbs de ratón o derivados de ratón y, por lo tanto, aumenten la eficacia y la seguridad de los anticuerpos administrados. Se puede esperar que el uso de anticuerpos totalmente humanos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades huma-

10 nas crónicas y recurrentes, tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren administraciones repetidas de anticuerpos.

Un planteamiento hacia esta finalidad fue diseñar razas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón, con grandes fragmentos de los loci de Ig humanos en previsión de que dichos ratones produjeran un gran repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humana preservarían la gran diversidad génica variable así como la apropiada regulación de la producción y expresión de anticuerpos. Explotando la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el reproducido repertorio de anticuerpos humanos en estas razas de ratón proporcionaría anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Utilizando la tecnología de hibridomas, se podrían producir y seleccionar fácilmente mAbs humanos antigénicamente específicos con la especificidad deseada.

Esta estrategia general fue demostrada en relación con nuestra generación de las primeras razas XenoMouseTM, como se publicó en 1994. Véase Green *et al.*, Nature Genetics 7: 13-21 (1994). Las razas XenoMouseTM fueron diseñadas con cromosomas artificiales de levadura (YACs; del inglés, yeast artificial chromosomes) que contenían fragmentos de configuración de la línea germinal, de 245 kb y 190 kb, del locus de la cadena pesada humana y el locus de la cadena ligera kappa, respectivamente, que contenían secuencias centrales de regiones variables y constantes (idem). Se probó que los YACs que contenían Ig humana eran compatibles con el sistema del ratón tanto para el reordenamiento como para la expresión de anticuerpos y eran capaces de sustituir a los genes de Ig de ratón inactivados. Esto fue demostrado por su capacidad para provocar el desarrollo de células B, producir un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos y generar mAbs humanos antigénicamente específicos. Estos resultados también sugerían que la introducción de porciones más grandes de los loci de Ig humana que contuvieran números mayores de genes V, elementos reguladores adicionales y regiones constantes de Ig humana podría recapitular sustancialmente el repertorio completo que es característico de la respuesta humoral humana a la infección y la inmunización. El trabajo de Green

35 *et al.* se extendió recientemente a la introducción de más de aproximadamente el 80% del repertorio de anticuerpos humanos por medio de la introducción de fragmentos de YAC de configuración de línea germinal, con un tamaño de megabases, de los loci de cadena pesada humana y los loci de cadena ligera kappa, respectivamente, para producir ratones XenoMouseTM. Véanse Mendez *et al.*, Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits, J. Exp. Med. 188: 483-495 (1998), y la Solicitud de Patente de EE.UU. n° de serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996, cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia.

Dicho planteamiento es adicionalmente discutido y delineado en las Solicitudes de Patente de EE.UU. números de serie: 07/466.008, presentada el 12 de Enero de 1990, 07/610.515, presentada el 8 de Noviembre de 1990, 07/919.297, presentada el 24 de Julio de 1992, 07/922.649, presentada el 30 de Julio de 1992, 08/031.801, presentada el 15 de Marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de Agosto de 1993, 08/234.145, presentada el 28 de Abril de 1994, 08/376.279, presentada el 20 de Enero de 1995, 08/430.938, presentada el 27 de Abril de 1995, 08/464.584, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/464.582, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/463.191, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/462.837, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/486.853, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/486.857, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/486.859, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/462.513, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/724.752, presentada el 2 de Octubre de 1996, y 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996. Véanse también Mendez *et al.*, Nature Genetics 15: 146-156 (1997), y Green y Jakobovits, J. Exp. Med. 188: 483-495 (1998). Véanse también la Patente Europea n° EP 0463151 B1, concesión publicada el 12 de Junio de 1996, Solicitud de Patente Internacional n° WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994, Solicitud de Patente Internacional n° WO 96/34096, publicada el 31 de Octubre de 1996, y WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998. Las descripciones de cada una de las

55 patentes, solicitudes y referencias anteriormente citadas se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

En un planteamiento alternativo, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un planteamiento de “minilocus”. En el planteamiento de minilocus, se mimetiza un locus de Ig exógeno mediante la inclusión de trozos (genes individuales) del locus de Ig. De este modo, se forman uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) en una construcción para inserción en un animal. Este planteamiento se describe en la Patente de EE.UU. número 5.545.807, concedida a Surani *et al.*, las Patentes de EE.UU. números 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650 y 5.814.318, cada una concedida a Lonberg y Kay, la Patente de EE.UU. n° 5.591.669, concedida a Krimpenfort y Berns; las Patentes de EE.UU. n°s 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215, concedidas a Berns

65 *et al.*, la Patente de EE.UU. n° 5.643.763, concedida a Choi y Dunn, y las Solicitudes Internacionales de Patente de EE.UU., de GenPharm, números de serie 07/574.748, presentada el 29 de Agosto de 1990, 07/575.962, presentada el 31 de Agosto de 1990, 07/810.279, presentada el 17 de Diciembre de 1991, 07/853.408, presentada el 18 de Marzo de 1992, 07/904.068, presentada el 23 de Junio de 1992, 07/990.860, presentada el 16 de Diciembre de 1992, 08/053.131,

presentada el 26 de Abril de 1993, 08/096.762, presentada el 22 de Julio de 1993, 08/155.301, presentada el 18 de Noviembre de 1993, 08/161.739, presentada el 3 de Diciembre de 1993, 08/165.699, presentada el 10 de Diciembre de 1993, y 08/209.741, presentada el 9 de Marzo de 1994, cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia. Véanse también la Patente Europea nº 0546073 B1, y las Solicitudes de Patente Internacional números WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884, cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad. Véanse además Taylor *et al.*, 1992; Chert *et al.*, 1993; Tuailon *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 1993; Lonberg *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1994; Tuailon *et al.*, 1995; y Fishwild *et al.*, 1996, cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Los inventores de Surani *et al.*, anteriormente citados y asignados al Medical Research Counsel (el "MRC"), produjeron un ratón transgénico que poseía un locus de Ig mediante el uso del planteamiento de minilocus. Los inventores del trabajo de GenPharm International anteriormente citados, Lonberg y Kay, siguiendo la dirección de los presentes inventores, propusieron la inactivación del locus endógeno de Ig de ratón acoplada con la duplicación sustancial del trabajo de Surani *et al.*

Una ventaja del planteamiento de minilocus es la rapidez con la que se pueden generar construcciones que incluyan porciones del locus de Ig y se pueden introducir en animales. Sin embargo, proporcionalmente, una desventaja significativa del planteamiento de minilocus es que, en teoría, se introduce una diversidad insuficiente mediante la inclusión de pequeños números de genes V, D y J. En realidad, parece que el trabajo publicado apoya esta cuestión. El desarrollo de células B y la producción de anticuerpos por animales producidos mediante el uso del planteamiento de minilocus parecen poco desarrollados. Por lo tanto, la investigación que rodea el presente invento ha sido consistentemente dirigida hacia la introducción de grandes porciones del locus de Ig con objeto de alcanzar una mayor diversidad y en un esfuerzo para reconstituir el repertorio inmune de los animales.

Las respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA; del inglés, human anti-mouse antibodies) han conducido a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o, si no, humanizados. Aunque los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable murina, se espera observar ciertas respuestas de anticuerpos humanos anti-quiméricos (HACA; del inglés, human anti-chimeric antibodies), particularmente en utilizaciones del anticuerpo crónicas o de dosis múltiples. Por lo tanto, sería deseable proporcionar anticuerpos totalmente humanos contra CTLA-4 con objeto de invalidar los asuntos y/o efectos de la respuesta de HAMA o HACA.

Tecnologías de humanización y presentación

Como se discutió anteriormente en relación con la generación de anticuerpos humanos, hay ventajas a la hora de producir anticuerpos con inmunogenicidad reducida. Hasta cierto punto, esto se puede llevar a cabo en relación con técnicas de humanización y técnicas de presentación utilizando bancos apropiados. Se apreciará que, utilizando técnicas bien conocidas en este campo técnico, se pueden humanizar o primatizar anticuerpos murinos o anticuerpos de otras especies. Véanse, por ejemplo, Winter y Harris *Immunol. Today* 14: 43-46 (1993), y Wright *et al.*, *Crit. Reviews in Immunol.* 12: 125-168 (1992). El anticuerpo de interés puede ser diseñado por técnicas de DNA recombinante para sustituir los dominios CH1, CH2, CH3 y bisagra, y/o el dominio de armazón, por la correspondiente secuencia humana (véanse el Documento WO 92/02190 y las Patentes de EE.UU. números 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350 y 5.777.085). Además, en la técnica se conoce el uso de cDNA de Ig para la construcción de genes inmunoglobulínicos quiméricos [Liu *et al.*, *P.N.A.S.* 84: 3439 (1987), y J. *Immunol.* 139: 3521 (1987)]. Se aísla mRNA de un hibridoma u otra célula que produzca el anticuerpo y se utiliza para producir cDNA. El cDNA de interés puede ser multiplicado mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos (Patentes de EE.UU. números 4.683.195 y 4.683.202). Alternativamente, se prepara un banco y se explora para aislar la secuencia de interés. La secuencia de DNA que codifica la región variable del anticuerpo es luego fusionada con secuencias de regiones constantes humanas. Las secuencias de genes de regiones constantes humanas pueden hallarse en Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Publicación nº 91-3242 del N.I.H. Los genes de regiones C humanas son fácilmente asequibles a partir de clones conocidos. La elección del isotipo vendrá guiada por las deseadas funciones efectoras, tal como la fijación del complemento, o la actividad en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los isotipos preferidos son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los isotipos particularmente preferidos para los anticuerpos del invento son IgG2 e IgG4. Se puede utilizar cualquiera de las regiones constantes de cadenas ligeras humanas, kappa o lambda. Luego se expresa el anticuerpo humanizado quimérico mediante métodos convencionales.

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab, por escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante una escisión química o con proteasas. Alternativamente, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codificara una porción del fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de DNA que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguidas de un codón de terminación de la traducción para producir la molécula truncada.

En un planteamiento, se pueden usar secuencias de consenso que codifiquen las regiones J de cadenas pesadas y ligeras para diseñar oligonucleótidos para uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para el subsiguiente enlace de segmentos de la región V con segmentos de la región C humana. Se puede modificar el cDNA de la región C mediante mutagénesis dirigida al sitio, para situar un sitio de restricción en la posición análoga de la secuencia humana.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, YACs, episomas derivados del EBV, y similares. Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia inmunoglobulínica de CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados, diseñado para que cualquier secuencia de VH o VL pueda ser fácilmente insertada y expresada. En dichos vectores, se produce normalmente corte y empalme entre el sitio de corte y empalme del donante de la región J insertada, y el sitio de corte y empalme del aceptor que precede a la región C humana, y también en las regiones de corte y empalme que se encuentran en los exones de CH humanos. Se producen poliadenilación y terminación de transcripción en sitios cromosómicos nativos cadena abajo de las regiones de codificación. El anticuerpo quimérico resultante puede estar unido a cualquier potente promotor, incluyendo LTRs retrovirales, tales como, por ejemplo, el promotor precoz de SV-40 [Okayama *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3: 280 (1983)], la LTR del virus del sarcoma de Rous [Gorman *et al.*, P.N.A.S. 79: 6777 (1982)] y la LTR del virus de la leucemia murina de Moloney [Grosschedl *et al.*, Cell 41: 885 (1985)], promotores de Ig nativos, etc.

Además, se pueden generar anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies por medio de tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación ribosómica y otras técnicas, utilizando técnicas bien conocidas en este campo técnico, y las moléculas resultantes pueden ser sometidas a una maduración adicional, tal como maduración de afinidad, y dichas técnicas son bien conocidas en este campo técnico: Wright y Harris, *supra*, Hanes y Pluchau, PNAS USA 94: 4937-4942 (1997) (presentación ribosómica); Parmley y Smith, Gene 73: 305-318 (1988) (presentación en fagos); Scott, TIBS 17: 241-245 (1992); Cwirla *et al.*, PNAS USA 87: 6378-6382 (1990); Rusell *et al.*, Nucl. Acids Research 21: 1081-1085 (1993); Hoganboom *et al.*, Immunol. Reviews 130: 43-68 (1992); Chiswell y McCafferty, TIBTECH 10: 80-84 (1992); y la Patente de EE.UU. n° 5.733.743. Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no sean humanos, dichos anticuerpos pueden ser humanizados del modo anteriormente descrito.

Utilizando estas técnicas, se pueden generar anticuerpos contra células que expresan CTLA-4, el propio CTLA-4, formas de CTLA-4, epítopos o péptidos del mismo, y bancos de expresión para el mismo (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 5.703.057) que pueden ser luego explorados, del modo anteriormente descrito, en cuanto a las actividades anteriormente descritas.

30 Criterios adicionales para compuestos terapéuticos de anticuerpo

Como se apreciará, generalmente no es deseable matar las células que expresan CTLA-4. En vez de ello, generalmente se desea simplemente inhibir la unión de CTLA-4 con sus ligandos para mitigar la infrarregulación de células T. Uno de los principales mecanismos a través de los cuales los anticuerpos matan células es a través de la fijación del complemento y la participación en CDC. La región constante de un anticuerpo desempeña un papel importante en relación con la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento y participar en CDC. De este modo, se selecciona generalmente el isotipo de un anticuerpo para proporcionar o no la capacidad de fijación del complemento. Generalmente, en el caso del presente invento, como se mencionó anteriormente, no se prefiere utilizar un anticuerpo que mata las células. Hay diversos isotipos de anticuerpos que son capaces de fijación del complemento y CDC, incluyendo, sin limitación, los siguientes: IgM murina, IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IgM humana, IgG1 humana, e IgG3 humana; esos isotipos que no incluyen, sin limitación, IgG2 humana ni IgG4 humana.

Se apreciará que no es necesario que los anticuerpos que se generan posean inicialmente un isotipo deseado concreto, sino que, en vez de ello, el anticuerpo que se genera puede poseer cualquier isotipo y se puede cambiar más tarde el isotipo del anticuerpo usando técnicas convencionales que son bien conocidas en este campo técnico. Dichas técnicas incluyen, entre otras, el uso de técnicas recombinantes directas (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 4.816.397) y técnicas de fusión de célula-célula (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 08/730.639, presentada el 11 de Octubre de 1996).

En la técnica de fusión de célula-célula, se prepara un mieloma u otra línea celular que posea una cadena pesada con cualquier isotipo deseado, y se prepara otro mieloma u otra línea celular que posea la cadena ligera. Más tarde, se pueden fusionar dichas células y se puede aislar una línea celular que exprese un anticuerpo intacto.

A modo de ejemplo, la mayoría de los anticuerpos contra CTLA-4 aquí discutidos son anticuerpos IgG2 humanos anti-CTLA-4. Puesto que dichos anticuerpos poseen la unión deseada con la molécula de CTLA-4, se puede cambiar fácilmente el isotipo de cualquiera de dichos anticuerpos para generar, por ejemplo, un isotipo IgG4 humano que aún posea la misma región variable (que define la especificidad del anticuerpo y parte de su afinidad).

En consecuencia, puesto que se generan candidatos a anticuerpo que satisfacen los deseados atributos “estructurales” anteriormente discutidos, mediante el cambio de isotipo se pueden proporcionar generalmente con al menos ciertos atributos “funcionales” adicionales que se desean.

65 Diseño y generación de otros compuestos terapéuticos

Como se discutió anteriormente, la función efectora de los anticuerpos del invento puede ser cambiada por paso del isotipo a IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos.

En relación con la generación de compuestos terapéuticos de anticuerpo avanzados en que la fijación del complemento es un atributo deseable, puede resultar posible evitar la dependencia del complemento para la muerte celular por medio del uso de, por ejemplo, compuestos biespecíficos, inmunotoxinas o radiomarcadores.

- 5 En relación con los anticuerpos biespecíficos, se pueden generar anticuerpos biespecíficos que comprendan (i) dos anticuerpos, uno con especificidad para CTLA-4 y otro para una segunda molécula, que se conjugan conjuntamente, (ii) un solo anticuerpo que tiene una cadena específica para CTLA-4 y una segunda cadena específica para una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de una sola cadena que tiene especificidad para CTLA-4 y para la otra molécula. Dichos anticuerpos biespecíficos pueden ser generados utilizando técnicas que son bien conocidas; por ejemplo, en relación
10 con (i) y (ii), véanse, por ejemplo, Fanger *et al.*, Immunol. Methods 4: 72-81 (1994), y Wright y Harris, *supra*, y, en relación con (iii), véase, por ejemplo, Traunecker *et al.*, Int. J. Cancer (Supl.) 7: 51-52 (1992).

Además, también se pueden preparar "Kappacuerpos" [Ill *et al.*, "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions", Protein Eng. 10: 949-57 (1997)], "Minicuerpos" [Martin *et al.*, "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6", EMBO J, 13: 5303-9 (1994).], "Diacuerpos" [Holliger *et al.*, "Diabodies: Small bivalent and bispecific antibody fragments", PNAS USA 90: 6444-6448 (1993)], o "Janusins" [Traunecker *et al.*, "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells", EMBO J. 10: 3655-3659 (1991), y Traunecker *et al.*, "Janusin: New molecular design for bispecific reagents", Int. J. Cancer, Supl. 7: 51-52 (1992)].
15
20

En relación con las inmunotoxinas, se pueden modificar anticuerpos para que actúen como inmunotoxinas utilizando técnicas que son bien conocidas en este campo técnico. Véase, por ejemplo, Vitetta, Immunol. Today 14: 252 (1993). Véase también la Patente de EE.UU. n° 5.194.594. En relación con la preparación de anticuerpos radiomarcados, dichos anticuerpos modificados pueden ser también fácilmente preparados usando técnicas que son bien
25 conocidas en este campo técnico. Véase, por ejemplo, Junghans *et al.* en "Cancer Chemotherapy and Biotherapy", 655-686 [2ª edición, redactado por Chafner y Longo, Lippincott Raven (1996)]. Véanse también las Patentes de EE.UU. n°s 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (RE 35.500), 5.648.471 y 5.697.902. Sería probable que cada una de las inmunotoxinas y las moléculas radiomarcadas matara células que expresan CTLA-4, y particularmente aquellas células en que los anticuerpos del invento son eficaces.
30

Administración terapéutica y formulaciones

Se apreciará que la administración de elementos terapéuticos de acuerdo con el invento se llevará a cabo con
35 vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar una transferencia, una distribución y una tolerancia mejoradas, y similares. En el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: "Remington's Pharmaceutical Sciences" [15ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, EE.UU. (1975)], particularmente en su Capítulo 87 de Blaug y Seymour, se pueden hallar múltiples formulaciones apropiadas. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, bálsamos, ceras, aceites, lípidos, vesículas (tales como Lipofectin™) que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos), productos de conjugación de DNA,
40 pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Cualquiera de las mezclas precedentes puede ser apropiada en los tratamientos y terapias de acuerdo con el presente invento con tal de que el ingrediente activo de la formulación no resulte inactivado por la formulación y que la formulación sea
45 fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Para una información adicional relativa a excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos, véase también Powell *et al.*, "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA J. Pharm. Sci. Technol. 52: 238-311 (1998) y las citas del mismo.

Preparación de anticuerpos

Los anticuerpos de acuerdo con el invento son preferiblemente preparados mediante la utilización de un ratón transgénico que tiene insertada una porción sustancial del genoma productor de anticuerpos humano pero que se ha
55 hecho deficiente en la producción de anticuerpos murinos endógenos. Entonces, dichos ratones son capaces de producir anticuerpos y moléculas inmunoglobulínicas humanas y son deficientes en la producción de anticuerpos y moléculas inmunoglobulínicas murinas. En las patentes, solicitudes y referencias descritas en la presente sección "Fundamento" se describen las tecnologías utilizadas para alcanzar lo anterior. Sin embargo, en particular, en la Solicitud de Patente de EE.UU. n° de serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996, cuya descripción se incorpora aquí por referencia, se describe una realización preferida para la producción transgénica de ratones y anticuerpos de los mismos.
60 Véase también Mendez *et al.*, Nature Genetics 15: 146-156 (1997), cuya descripción se incorpora aquí por referencia.

Mediante el uso de dicha tecnología, hemos producido anticuerpos monoclonales totalmente humanos hacia una diversidad de antígenos. Esencialmente, inmunizamos líneas XenoMouse™ de ratones con un antígeno de interés, recuperamos células linfáticas (tales como células B) de los ratones que expresan anticuerpos y fusionamos dichas
65 células recuperadas con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales, y dichas líneas celulares de hibridoma son exploradas y seleccionadas para identificar las líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. Utilizamos estas técnicas de acuerdo con el presente invento para la preparación de anticuerpos específicos para CTLA-4. Describimos aquí la producción de

múltiples líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para CTLA-4. Además, proporcionamos una caracterización de los anticuerpos producidos por dichas líneas celulares, incluyendo análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de dichos anticuerpos.

5 Los anticuerpos derivados de líneas celulares de hibridoma aquí discutidas son denominados 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1. Cada uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares anteriormente mencionadas son cadenas pesadas de IgG2 o IgG4 totalmente humanas con cadenas ligeras kappa humanas. En general, los anticuerpos de acuerdo con el invento poseen unas afinidades muy elevadas, poseyendo típicamente unas Kd de aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 10^{-11} , cuando se mide por fase sólida
10 o fase de disolución.

Como se apreciará, los anticuerpos de acuerdo con el presente invento pueden expresarse en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican los cDNAs o clones genómicos para los anticuerpos concretos pueden ser utilizadas para la transformación de una adecuada célula huésped de mamífero o de no mamífero.
15 La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector vírico) y transducir una célula huésped con el virus (o el vector), o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica en las Patente de EE.UU. n^{os} 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455 (patentes que se incorporan aquí por referencia). El procedimiento de transformación utilizado depende del huésped que se va a transformar. Los métodos
20 para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por Polybrene, fusión de protoplastos, electroporación, bombardeo con partículas, encapsulación del(de los) polinucleótido(s) en liposomas, productos de conjugación peptídicos, dendrímeros, y microinyección directa del DNA en núcleos.

25 Las líneas celulares de mamífero asequibles como huéspedes para expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas asequibles del American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo, pero sin limitarse a, células de ovario de hámster chino (CHO; del inglés, chinese hamster ovary), células NSO₀, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK; del inglés, baby hamster kidney), células renales de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y otras numerosas líneas celulares. Para expresar anticuerpos recombinantes, también se pueden usar células que no sean de mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, células bacterianas, de levadura, de insecto y de plantas. Se puede preferir la mutagénesis del dominio CH2 del anticuerpo, dirigida al sitio, para eliminar la glicosilación con objeto de evitar cambios en las funciones inmunogénicas, farmacocinéticas y/o efectoras que resultan de una glicosilación no humana. Los métodos de expresión se seleccionan determinando qué sistema genera los mayores niveles de expresión y produce anticuerpos con propiedades ligantes de
30 CTLA-4 constitutivas.
35

Además, la expresión de anticuerpos del invento (u otros grupos de los mismos) a partir de líneas celulares de producción puede ser potenciada utilizando diversas técnicas conocidas. Por ejemplo, los sistemas de expresión de los genes de glutamina sintetasa y DHFR son planteamientos comunes para potenciar la expresión bajo ciertas condiciones. Se pueden identificar clones celulares de alta expresión utilizando técnicas convencionales, tales como clonación por dilución limitada y tecnología Microdrop. El sistema GS se discute, en todo o en parte, en relación con las Patentes Europeas números 0216846, 0256055 y 0323997 y la Solicitud de Patente Europea número 89303964.4.
40

Los anticuerpos del invento pueden ser también producidos transgénicamente mediante la generación de un mamífero o vegetal que sea transgénico en cuanto a las secuencias de cadenas pesadas y ligeras inmunoglobulínicas de interés y la producción del anticuerpo en forma recuperable a partir de él. En relación con la producción transgénica en mamíferos, se pueden producir anticuerpos en, y recuperar de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957.
45

Los anticuerpos de acuerdo con el presente invento han sido analizados estructural y funcionalmente. En relación con las estructuras de los anticuerpos, se han pronosticado las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras kappa basándose en la secuencia de cDNA obtenida por medio de una RT-PCR de los hibridomas. Véanse los Ejemplos 3 y 4 y las Figuras 1-8. Se llevó también a cabo la secuenciación N-terminal de los anticuerpos para confirmación de los resultados discutidos en los Ejemplos 3 y 4. Véanse el Ejemplo 5 y la Figura 9. Se llevaron a cabo análisis cinéticos de los anticuerpos para determinar afinidades. Véase el Ejemplo 2. Además, se analizaron los anticuerpos por enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis en gel reductor (SDS-PAGE), cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en fase líquida/espectroscopia de masas y espectroscopia de masas, y se evaluó la producción de anticuerpos por los hibridomas. Véanse el Ejemplo 6 y la Figura 10.
50
55

En relación con el análisis funcional de los anticuerpos de acuerdo con el presente invento, se probó que dichos anticuerpos son potentes inhibidores de CTLA-4 y de su unión con sus ligandos de la familia B7 de moléculas. Por ejemplo, se demostró que anticuerpos de acuerdo con el presente invento bloqueaban la unión de CTLA-4 con B7-1 o B7-2. Véase el Ejemplo 7. En realidad, muchos de los anticuerpos de acuerdo con el invento poseen unas IC₅₀ nanomolares y subnanomolares con respecto a la inhibición de la unión de CTLA-4 a B7-1 y B7-2. Además, los anticuerpos del invento poseen una excelente selectividad para CTLA-4 en comparación con CD28, CD44, B7-2 o hlgG1. Véase el Ejemplo 8. La selectividad es una relación que refleja el grado de unión preferente de una molécula con un primer agente en comparación con la unión de la molécula con un segundo agente y, opcionalmente, otras moléculas. Aquí, la selectividad se refiere al grado de unión preferente de un anticuerpo del invento con CTLA-4 en
60
65

ES 2 340 745 T3

comparación con la unión del anticuerpo con otras moléculas tales como CD28, CD44, B7-2 y hIgG1. Son comunes los valores de selectividad superiores a 500:1 en los anticuerpos del invento. También se ha demostrado que los anticuerpos del invento provocan o potencian la expresión de ciertas citocinas (tales como IL-2 e IFN- γ) por células T cultivadas, en un modelo de blastos de células T. Véanse los Ejemplos 9 y 10 y las Figuras 12-17. Además, se espera que los anticuerpos del invento inhiban el crecimiento de tumores en modelos tumorales *in vivo* apropiados. El diseño de dichos modelos se discute en los Ejemplos 11 y 12.

Los resultados demostrados de acuerdo con el presente invento indican que anticuerpos del presente invento poseen ciertas calidades que les pueden hacer más eficaces que los actuales anticuerpos terapéuticos contra CTLA-4.

En particular, los anticuerpos 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1 poseen propiedades muy deseables. Sus características estructurales, funciones o actividades proporcionan criterios que facilitan el diseño o la selección de anticuerpos adicionales u otras moléculas como las anteriormente discutidas. Dichos criterios incluyen uno o más de los siguientes:

capacidad para competir con uno o más de los anticuerpos del invento por unirse a CTLA-4;

especificidad ligante para CTLA-4 similar a la de uno o más de los anticuerpos del invento;

una afinidad ligante por CTLA-4 de aproximadamente 10^{-9} M o superior, y preferiblemente de aproximadamente 10^{-10} M o superior;

no reacciona cruzadamente con un CTLA-4 de mamífero inferior, incluyendo preferiblemente CTLA-4 de ratón, rata o conejo, y preferiblemente CTLA-4 de ratón o rata;

reacciona cruzadamente con CTLA-4 de primate, incluyendo preferiblemente CTLA-4 de cynomolgus y rhesus;

una selectividad para CTLA-4 con respecto a CD28, B7-2, CD44 o hIgG1 de al menos aproximadamente 100:1 o superior, y preferiblemente de aproximadamente 300, 400 ó 500:1 o superior;

una IC_{50} en cuanto a bloquear la unión de CTLA-4 con B7-2 de aproximadamente 100 nM o inferior, y preferiblemente de 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 ó 0,38 nM o inferior;

una IC_{50} en cuanto a bloquear la unión de CTLA-4 con B7-1 de aproximadamente 100 nM o inferior, y preferiblemente de 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 ó 0,50 nM o inferior;

Una potenciación de la producción de citocinas en uno o más ensayos *in vitro*, por ejemplo:

una potenciación de la producción de IL-2 en un ensayo con blastos de células T/Raji, de aproximadamente 500 pg/ml o superior y preferiblemente de 750, 1000, 1500, 2000, 3000 ó 3846 pg/ml o superior;

una potenciación de la producción de IFN- γ en un ensayo con blastos de células T/Raji, de aproximadamente 500 pg/ml o superior y preferiblemente de 750, 1000 ó 1233 pg/ml o superior; o

una potenciación de la producción de IL-2 en un ensayo con hPBMC o con sangre completa y superantígeno, de aproximadamente 500 pg/ml o superior y preferiblemente de 750, 1000, 1200 ó 1511 pg/ml o superior. Expresado de otro modo, es deseable que, en el ensayo, la producción de IL-2 resulte potenciada en aproximadamente un 30, 35, 40, 45, 50 o más por ciento con respecto al testigo.

Se espera que los anticuerpos (o las moléculas diseñadas o sintetizadas a partir de ellos) que tienen una o más de estas propiedades posean una eficacia similar a la de los anticuerpos descritos en el presente invento.

Las deseables propiedades funcionales anteriormente discutidas pueden resultar a menudo de la unión a, y la inhibición de, CTLA-4 por una molécula (es decir, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o pequeña molécula) de una manera similar a la de un anticuerpo del invento (es decir, la unión a un epítipo igual o similar de la molécula de CTLA-4).

La molécula puede ser administrada directamente (es decir, administración directa de dichas moléculas a un paciente) o, alternativamente, la molécula puede ser "administrada" indirectamente [es decir, un péptido o similar que produce una respuesta inmune en un paciente (similar a una vacuna), en que la respuesta inmune incluye la generación de anticuerpos que se unen a un epítipo igual o similar, o un anticuerpo o fragmento que se produce *in situ* después de la administración de materiales genéticos que codifican dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a un epítipo igual o similar]. De este modo, se apreciará que el epítipo de CTLA-4 al que se unen los anticuerpos del invento puede ser útil en relación con la preparación y/o el diseño de productos terapéuticos de acuerdo con el invento. En el diseño de fármacos, también es a menudo útil la información negativa (es decir, resulta útil el hecho de que un anticuerpo que se une a CTLA-4 no parezca unirse a un epítipo que actúa como un inhibidor de CTLA-4). De esta forma, el epítipo al que se unen anticuerpos del invento que no conducen a la funcionalidad deseada puede ser también

muy útil. En consecuencia, de acuerdo con el presente invento también se contemplan moléculas (y particularmente anticuerpos) que se unen a un epítopo igual o similar al que se unen anticuerpos del invento.

Además del hecho de que, de acuerdo con el invento, se contemplan anticuerpos del invento y los epítopos a los que se unen, hemos realizado ciertos estudios preliminares sobre mapeo epitópico de ciertos anticuerpos de acuerdo con el invento y particularmente del anticuerpo 4.1.1 y el anticuerpo 11.2.1 del invento.

Como primera operación, llevamos a cabo estudios de competición BIAcore para generar un mapa basto de unión entre ciertos anticuerpos del invento en relación con su capacidad para competir por unirse a CTLA-4. Con este fin, se unió CTLA-4 a un chip BIAcore y se unió a él un primer anticuerpo bajo condiciones saturantes, y se midió la competición de subsiguientes anticuerpos secundarios que se unen a CTLA-4. Esta técnica permitía la generación de un basto mapa en el que pueden clasificarse familias de anticuerpos.

A lo largo de este proceso, determinamos que ciertos anticuerpos podían ser clasificados en las siguientes categorías epitópicas:

Categoría	Anticuerpos	Competición por unirse a CTLA-4
A	BO1M*	Libre competencia cruzada entre sí; competencia cruzada con la categoría B; cierta competencia cruzada con la categoría D
	BO2M**	
B	4.1.1	Libre competencia cruzada entre sí; competencia cruzada con las categorías A, C y D
	4.13.1	
C	6.1.1	Libre competencia cruzada entre sí; competencia cruzada con la categoría B y la categoría D
	3.1.1	
	4.8.1	
	11.2.1	
	11.6.1	
	11.7.1	
D	4.14.3	Competencia cruzada con las categorías C y B; cierta competencia cruzada con la categoría A
E	4.9.1	BN13 bloquea la unión de 4.9.1 a CTLA-4, pero no a la inversa
	BN13***	
(*) (**) Asequibles de Biostride		
(***) Asequible de Pharmingen		

Como siguiente operación, procuramos determinar si los anticuerpos reconocían un epítopo lineal de CTLA-4 bajo condiciones reductoras y no reductoras en transferencias Western. Observamos que parecía que ninguno de los anticuerpos 4.1.1, 3.1.1, 11.7.1, 11.6.1 y 11.2.1 reconocía una forma reducida de CTLA-4 en las transferencias Western. En consecuencia, parecía probable que el epítopo al que se unía cada uno de estos anticuerpos no era un epítopo lineal sino, más probablemente, un epítopo conformacional cuya estructura podía haber sido invalidada bajo las condiciones reductoras.

Por lo tanto, buscamos determinar si podíamos aprender acerca de los restos de la molécula de CTLA-4 que eran importantes para la unión de los anticuerpos del invento. Una manera que utilizamos fue llevar a cabo evaluaciones cinéticas de las velocidades de disociación entre CTLA-4 humano y dos moléculas de CTLA-4 de primate muy conservadas (CTLA-4 de cynomolgus y tití). Estudios BIAcore demostraron que el anticuerpo 4.1.1 se unía a CTLA-4 de ser humano, cynomolgus y tití a la misma velocidad. Sin embargo, con respecto a las velocidades de disociación (afinidad), el anticuerpo 4.1.1 tenía la mayor afinidad (velocidad de disociación más lenta) para el ser humano, una velocidad de disociación más rápida para el cynomolgus y una velocidad de disociación mucho más rápida para el tití. Por otra parte, el anticuerpo 11.2.1 del invento se une a CTLA-4 de ser humano, cynomolgus y tití a aproximadamente

la misma velocidad y tiene aproximadamente la misma velocidad relativa de disociación para cada uno de los tres. Esta información indica además que los anticuerpos 4.1.1 y 11.2.1 se unen a diferentes epítomos de CTLA-4.

Para estudiar adicionalmente el epítomo al que se unen los anticuerpos de las categorías B y C del invento, llevamos a cabo ciertos estudios de mutagénesis dirigida al sitio. El CTLA-4 de tití posee dos importantes cambios en los restos 105 y 106 con respecto al CTLA-4 humano. Dichas diferencias son un cambio de leucina a metionina en el resto 105 y un cambio de glicocola a serina en el resto 106. En consecuencia, mutamos el cDNA que codifica CTLA-4 humano para que codificara un CTLA-4 mutado que tuviera los cambios L105M y G106S. El CTLA-4 mutante por sustitución homóloga no efectuaba la unión de una proteína de fusión B7-2-IgG1. Además, no se efectuó la unión con el anticuerpo 11.2.1 del invento. Sin embargo, dicha molécula estaba significativamente inhibida en su capacidad para unirse con el anticuerpo 4.1.1 (similarmemente a la de tití). A continuación, mutamos un cDNA que codificaba CTLA-4 de tití para crear un CTLA-4 mutante de tití que tuviera un cambio S106G. Dicho cambio daba lugar al restablecimiento de la unión estable entre el anticuerpo 4.1.1 y el CTLA-4 mutante de tití. Además, mutamos un cDNA que codificaba CTLA-4 de tití para crear un CTLA-4 mutante de tití que tuviera un cambio M105L. Dicho cambio restablecía parcialmente la unión entre el anticuerpo 4.1.1 y el CTLA-4 mutante.

Parece que cada uno de los anticuerpos de las categorías B a D del invento posee similares propiedades funcionales y tiene el potencial para actuar como un potente agente terapéutico anti-CTLA-4. Además, cada una de las moléculas presenta cierta competencia cruzada en su unión con CTLA-4. Sin embargo, como se observará de la discusión anterior, parece que cada una de las moléculas de las diferentes categorías se une a diferentes epítomos conformacionales de CTLA-4.

A partir de lo precedente, se apreciará que la información epitópica anteriormente discutida indica que los anticuerpos (u otras moléculas, como se discutió anteriormente) que compiten cruzadamente con anticuerpos del invento tendrán probablemente cierto potencial terapéutico de acuerdo con el presente invento. Además, se espera que los anticuerpos (u otras moléculas, como se discutió anteriormente) que compiten cruzadamente con anticuerpos del invento (es decir, compiten cruzadamente con anticuerpos de las categorías B, C y/o D) tendrán probablemente cierto potencial terapéutico adicional de acuerdo con el presente invento. Además, se espera que los anticuerpos (u otras moléculas, como se discutió anteriormente) que compiten cruzadamente con anticuerpos del invento (es decir, compiten cruzadamente con anticuerpos de las categorías B, C y/o D) y que (i) no tienen reducida su unión con CTLA-4 de tití (similarmemente al anticuerpo 11.2.1) o (ii) tienen reducida su unión con CTLA-4 de tití (similarmemente al anticuerpo 4.1.1) tendrán probablemente cierto potencial terapéutico adicional de acuerdo con el presente invento. Los anticuerpos (u otras moléculas, como se discutió anteriormente) que compiten con las categorías A y E pueden tener también cierto potencial terapéutico.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes, que incluyen los experimentos llevados a cabo y los resultados alcanzados, se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no deben ser considerados restrictivos del presente invento.

Ejemplo 1

Generación de hibridomas que producen anticuerpos anti-CTLA-4

Se prepararon, seleccionaron y analizaron anticuerpos del invento de acuerdo con el presente Ejemplo.

Preparación de antígenos: Se prepararon tres inmunógenos distintos para la inmunización de los ratones XenoMouse™: (i) una proteína de fusión CTLA-4-IgG, (ii) un péptido de CTLA-4 y (iii) células de linfoma murino 300.19 transfectadas con un mutante de CTLA-4 (Y201 V) que se expresa constitutivamente en la superficie celular.

(i) Proteína de fusión CTLA-4-IgG1

Construcción del vector de expresión

El cDNA que codifica los dominios extracelulares maduros de CTLA-4 fue multiplicado por PCR a partir de un banco de cDNA de timo humano (Clontech) usando cebadores diseñados para la secuencia publicada [Eur. J. Immunol. 18: 1901-1905 (1988)]. El fragmento fue direccionamente subclonado en pSR5, un plásmido de expresión del virus Sindbis (InVitrogen), entre el péptido señal de la oncostatina M humana y los dominios CH1/CH2/CH3 de IgG gamma 1 (IgG1) humana. La proteína de fusión no contiene un dominio bisagra pero contiene una cisteína 120 en el dominio extracelular de CTLA-4 para formar un dímero covalente. El vector resultante fue denominado CTLA-4-IgG1/pSR5. La secuencia del cDNA de CTLA-4-IgG1 completo en el vector fue confirmada en ambas cadenas. Más adelante se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína CTLA-4-Ig. El dominio extracelular maduro para CD44 fue multiplicado por PCR a partir de un banco de linfocitos humanos (Clontech) y fue subclonado en pSinRep5 para generar una proteína testigo con la cola de IgG1 idéntica.

Proteína de fusión OM-CTLA-4-IgG1:

MGVLLTORTLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGIASFVC
EYASPGKATEVRVTVLRRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICT
GTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGLIGNGTQIY
VIDPEPCPDSLEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPTPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Subrayado: péptido señal

Negrita: dominio extracelular de CTLA-4

Los cDNAs para el dominio extracelular maduro de CD28 fueron multiplicados por PCR a partir de un banco de linfocitos humanos (Clontech) y fueron luego subclonados en pCDM8 [J. Immunol. 151: 5261-71 (1993)] para producir una proteína de fusión de IgG1 humana que contenía regiones tanto bisagra como de escisión por trombina. Se clonaron CTLA-4 de tití, cynomolgus y rhesus a partir de mRNA aislado de PBMCs estimuladas con PHA, usando técnicas estándares de PCR degenerada. La secuenciación demostró que las secuencias de aminoácidos de rhesus y cynomolgus eran idénticas con tres diferencias con respecto a dominio extracelular maduro de CTLA-4 humano (S13N, I17T y L105M). El CTLA-4 de tití presentaba 10 diferencias de aminoácidos con respecto al dominio extracelular maduro de CTLA-4 humano (V21A, V33I, A41T, A51G, 54I, S71F, Q75K, T88M, L105M y G106S). Se utilizó una mutagénesis dirigida al sitio para crear mutaciones puntuales únicas de todos los aminoácidos diferentes en el CTLA-4 de tití, para mapear los aminoácidos importantes para la interacción de los anticuerpos con IgG-CTLA-4 humano. Mediante la mutagénesis dirigida al sitio Matchmaker (Promega) se generaron mutaciones de IgG-CTLA-4 humano y de tití para el mapeo epitópico. Se produjeron las proteínas de fusión de IgG mediante la transfección transitoria de células COS7 y se purificaron utilizando técnicas estándares con proteína A. Las proteínas CTLA-4-IgG mutantes fueron evaluadas en cuanto a la unión a anticuerpos mediante inmunotransferencia y utilizando análisis BIAcore.

Expresión/purificación de proteínas recombinantes

Se generó un virus Sindbis recombinante al someter células renales de cría de hámster a electroporación (Gibco) con SP6 *in vitro*, mRNA de CTLA-4-IgG1/pSR5 transcrito y mRNA auxiliar de DH-26S, del modo descrito por InVitrogen. Cuarenta y ocho horas más tarde, se recolectó el virus recombinante y se tituló en células ováricas de hámster chino (CHO-K1) en cuanto a una óptima expresión proteica. Se cultivaron células CHO-K1 en suspensión en DMEM/F12 (Gibco) que contenía suero bovino fetal (FBS; del inglés, fetal bovine serum; Gibco) al 10%, térmicamente inactivado, aminoácidos no esenciales (Gibco), glutamina 4 mM (Gibco), penicilina/estreptomicina (Gibco) y HEPES 10 mM, pH de 7,5 (Gibco). Para producir CTLA-4-IgG, las células CHO-K1 fueron resuspendidas en DMEM/F12 en una concentración de 1×10^7 células/ml y fueron incubadas con el virus Sindbis durante una hora a temperatura ambiental. Las células fueron luego diluidas hasta una concentración de 1×10^6 /ml en DMEM/F12 que contenía suero bovino fetal al 1% desprovisto de IgG bovina tras usar proteína A-Sepharose (Pharmacia), aminoácidos no esenciales, glutamina 4 mM, HEPES 12,5 mM, pH de 7,5, y penicilina/estreptomicina. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se separaron las células como sedimento de centrifugación, se recogió el medio acondicionado y se complementó con tabletas de inhibidores completos de proteasas (Boehringer Mannheim), se ajustó el pH a 7,5 y se filtró el medio a través de filtros de $0,2 \mu\text{m}$ (Nalgene). Se utilizó una cromatografía rápida de proteínas en fase líquida (Pharmacia) para purificar la proteína de fusión por afinidad, utilizando una columna HiTrap de proteína A de 5 ml de capacidad (Pharmacia) y un caudal de 10 ml/min. La columna fue lavada con 30 volúmenes de lecho de PBS y fue sometida a elución con glicocola 0,1 M/HCl, pH de 2,8, y un caudal de 1 ml/min. El pH de las fracciones (1 ml) fue inmediatamente neutralizado a 7,5 con Tris, pH de 9. Las fracciones que contenían CTLA-4-IgG1 fueron identificadas mediante SDS-PAGE y fueron luego concentradas utilizando Centriplus 50 (Amicon) antes de ser aplicadas a una columna de Sepharose 200 (Pharmacia) utilizando PBS como disolvente y un caudal de 1 ml/min. Las fracciones que contenían CTLA-4-IgG1 fueron reunidas, esterilizadas por filtración a través de un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ (Millipore), divididas en partes alícuotas y congeladas a -80°C . Se expresó y purificó CD44-IgG1 usando los mismos métodos. Se purificó CD28-IgG a partir de medios acondicionados procedentes de células COS7 transitoriamente transfectadas.

Caracterización de CTLA-4-IgG1

El CTLA-4-IgG1 purificado migraba como una sola banda en SDS-PAGE utilizando una tinción con Coomassie coloidal (Novex). Bajo condiciones no reductoras, CTLA-4-IgG1 era un dímero (100 kDa), que se reducía a un monómero de 50 kDa cuando era tratado con DTT 50 mM. La secuenciación de aminoácidos en disolución del CTLA-4-

IgG1 purificado confirmó el extremo N de CTLA-4 (MHVAQPAVVLAS) y que el péptido señal de la oncostatina M era escindido de la proteína de fusión madura.

El CTLA-4-IgG1 se unía a B7-1-IgG inmovilizado, de un modo dependiente de la concentración, y la unión era bloqueada por un anticuerpo de hámster anti-CTLA-4 humano (BNI3; Pharmingen). El CTLA-4-IgG estéril estaba exento de endotoxinas y fue cuantificado por densidad óptica a 280 nm usando 1,4 como coeficiente de extinción. La producción de CTLA-4-IgG purificado variaba entre 0,5 y 3 mg/litro de células CHO-K1.

(ii) Péptido de CTLA-4

Se preparó el siguiente péptido de CTLA-4 de la manera descrita más adelante:

NH₂:MHVAQPAVVLA
SSRGLASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVT
EVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICK
VELMYPPPYLGGINGTQIYVIDPEPC-CONH₂

Abreviaturas/materiales

NMP, N-metilpirrolidinona; TFE, 2,2,2-trifluoroetanol; DCM, diclorometano; Fmoc, fluorenil-metoxycarbonilo. Todos los reactivos fueron suministrados por Perkin Elmer con las excepciones siguientes: TFE, Aldrich Chemical; resina de Fmoc-PAL-PEG, Perseptive Biosystems. Se usaron Fmoc-Arg(PMC)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Lys(BOC)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH y Fmoc-Tyr(tBu)-OH para los aminoácidos que requerían grupos protectores de cadenas laterales.

Síntesis peptídica

La síntesis peptídica se llevó a cabo en un aparato Perkin-Elmer 431a, retroprovisto de control por retroalimentación a través de absorbancia UV a 301 nm (detector de Perkin-Elmer, Modelo 759A). La secuencia peptídica fue ensamblada en una resina de Fmoc-PAL-PEG utilizando ciclos condicionales de copulación doble. Se llevaron a cabo copulaciones dobles forzadas en los ciclos 10, 11, 18, 19, 20 y 28 a 33. La resina fue lavada con una mezcla de DCM y TFE al 50% a la compleción de cada ciclo de acilación, lo que fue seguido del remate terminal de los grupos amino sin reaccionar con anhídrido acético en NMP. Se retiró la resina del reactor después de completarse el ciclo 49 y se continuó el resto hasta la compleción. La escisión del péptido de la resina se llevó a cabo utilizando Reactivo K [King *et al.*, International Journal of Protein and Peptide Research 36: 255-266 (1990)] durante 6 horas sobre 415 mg de resina, lo que proporcionó 186 mg de péptido crudo de CTLA-4.

Caracterización peptídica

Se disolvieron partes alícuotas de 25 mg del péptido crudo de CTLA-4 en 5 ml de guanidina-HCl 6 M/K₂PO₃ 100 mM, en un pH de 6,4, y se eluyeron de una columna Hi Load Superdex 75 16/60 (16 mm x 600 mm, volumen de lecho de 120 ml), de Pharmacia, con guanidina-HCl 2 M/K₂PO₃ 100 mM, en un pH de 6,4, con un caudal de 2 ml/min, durante 180 minutos, recogiendo fracciones de 5 ml. Las fracciones fueron analizadas cargando 1,7 µl de las fracciones en un gel NuPAGE Laemmli, desarrollándolas con tampón MES de desarrollo y visualizándolas por medio de un protocolo Daichii para tinción con plata. Las fracciones que presentaban un peso molecular de 12 kDa, según se juzgó frente a patrones de peso molecular, fueron reunidas y fueron almacenadas a 4°C. Las fracciones combinadas fueron analizadas mediante UV y electroforesis en gel. La secuenciación de los aminoácidos fue llevada a cabo haciendo que un cartucho ProSorb (absorbido en una membrana de PVDF) absorbiera una muestra de 100 microlitros y lavando para eliminar las sales del tampón. La secuenciación se llevó a cabo en un aparato Applied Biosystems 420. Se observó la esperada secuencia N-terminal (M H V A Q P A V V L A). Una inmunotransferencia demostró que el péptido era reconocido por el anticuerpo BNI3 anti-CTLA-4 humano (Pharmingen). Para desalar, una parte alícuota que contenían 648 µg de material fue colocada en un tubo de diálisis con un corte de pesos moleculares de 3500 Da y fue dializada frente a TFA al 0,1%/H₂O a 4°C durante 9 días, con agitación. El contenido completo de la bolsa de diálisis fue liofilizado hasta un polvo.

(iii) Células 300.19 transfectadas con CTLA-4 (Y201V)

El cDNA de CTLA-4 de longitud completa fue multiplicado por PCR a partir de un banco de cDNA de timo humano (Stratagene) y fue subclonado en pIRESneo (Clontech). Utilizando el sistema de mutagénesis MatchMaker (Promega), se introdujo una mutación de CTLA-4 que da lugar a una expresión constitutiva en la superficie celular. La mutación de la tirosina Y201 por valina inhibe la unión de la proteína adaptina, AP50, que es responsable de la rápida internalización de CTLA-4 [Chuang *et al.*, J. Immunol. 159: 144-151 (1997)]. Se cultivaron células de linfoma murino 300.19, exentas de micoplasmas, en RPMI-1640 que contenía suero de ternera fetal al 10%, aminoácidos no

ES 2 340 745 T3

esenciales, penicilina/estreptomicina, glutamina 2 mM, HEPES 12,5 mM, pH de 7,5, y beta-mercaptoetanol 25 μ M. Las células fueron sometidas a electroporación (3x10⁶/0,4 ml de RPMI exento de suero) en una cámara de 1 ml de capacidad con 200 μ g de CTLA-4-Y201V/pIRESneo, usando 200 V/1180 μ F (Gibco CellPorator). Se dejaron las células en reposo durante 10 minutos y luego se añadieron 8 ml de medio RPMI completo previamente calentado. A las 48 horas, las células fueron diluidas hasta 0,5x10⁶/ml en medio RPMI completo que contenía 1 mg/ml de G418 (Gibco). Las células resistentes se multiplicaron, y se mostró que expresaban CTLA-4 en la superficie celular al utilizar el anticuerpo BNI3 conjugado con ficoeritrina (Pharmingen). Se aislaron células con alto nivel de expresión mediante separación en estado estéril.

10 *Inmunización y generación de hibridomas*

Se inmunizaron ratones XenoMouse (de 8 a 10 semanas de edad) (i) subcutáneamente en la base de la cola con 1x10⁷ células 300.19 que habían sido transfectadas para que expresaran CTLA-4, como se describió anteriormente, resuspendidas en disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) que contenía adyuvante completo de Freund, o (ii) subcutáneamente en la base de la cola con (a) 10 μ g de la proteína de fusión de CTLA-4 o (b) 10 μ g del péptido de CTLA-4, emulsionados con adyuvante completo de Freund. En cada caso, se repitió la dosis tres o cuatro veces en adyuvante incompleto de Freund. Cuatro días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección final del inmunógeno o las células en PBS. Linfocitos de bazo y/o ganglio linfático de los ratones inmunizados fueron fusionados con la línea celular murina P3 de mieloma, no secretora, y fueron sometidos a selección con HAT del modo previamente descrito [G. Galfre y C. Milstein, "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures", Methods Enzymol. 73: 3-46 (1981)]. Se recuperó un gran conjunto de hibridomas, todos los cuales secretaban anticuerpos IgG2 κ o IgG4 κ humanos específicos para CTLA-4 (detección del modo indicado más adelante).

25 *Ensayo ELISA*

Se llevó a cabo un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA, del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay) para la determinación de anticuerpos antigénicamente específicos en suero de ratón y en sobrenadantes de hibridomas, del modo descrito [Coligan *et al.*, Unidad 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays" en Current Protocols in Immunology (1994)], usando la proteína de fusión CTLA-4-Ig para capturar los anticuerpos. En los animales que se inmunizan con la proteína de fusión CTLA-4-Ig, exploramos además la reactividad inespecífica hacia la porción de Ig humana de la proteína de fusión. Esto se lleva a cabo utilizando placas para ELISA revestidas con IgG1 humana como testigo negativo de la especificidad.

En un ensayo ELISA preferido, se utilizan las técnicas siguientes:

Se revisten placas para ELISA con 100 μ l/pocillo del antígeno en tampón para revestimiento de placas [tampón de carbonato 0,1 M, pH de 9,6, y NaHCO₃ (peso molecular de 84), 8,4 g/l]. Luego se incuban las placas a 4°C durante la noche. Tras la incubación, se retira el tampón de revestimiento y se bloquea la placa con 200 μ l/pocillo de tampón de bloqueo [albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, bovine serum albumin) al 0,5%, Tween-20 al 0,1% y timerosal al 0,01% en PBS 1x] y se incuban a temperatura ambiental durante 1 hora. Alternativamente, las placas se guardan en una nevera con tampón de bloqueo y dispositivos selladores de placas. Se retira el tampón de bloqueo y se añaden 50 μ l/pocillo de sobrenadante de hibridoma, suero u otro sobrenadante de hibridoma (testigo positivo) y medio HAT o tampón de bloqueo (testigo negativo). Se incuban las placas a temperatura ambiental durante 2 horas. Después de la incubación, se lava la placa con tampón de lavado (PBS 1x). Se añade el anticuerpo de detección [es decir, anti-IgG2 humana-HRP generada en ratón (SB, n° 9070-05) para anticuerpos IgG2, o anti-IgG4 humana-HRP generada en ratón (SB, n° 9200-05) para anticuerpos IgG4] en una cantidad de 100 μ l/pocillo [anti-IgG2 humana-HRP generada en ratón a 1:2000 o anti-IgG4 humana-HRP generada en ratón a 1:1000 (cada uno diluido en tampón de bloqueo)]. Las placas se incuban a temperatura ambiental durante 1 hora y luego se lavan con tampón de lavado. A continuación, se añaden 100 μ l/pocillo de disolución de desarrollo recién preparada [10 ml de tampón de sustrato, 5 mg de OPD (o-fenilendiamina; Sigma, n° P-7288 del catálogo) y 10 μ l de H₂O₂ al 30% (Sigma)] a los pocillos. Se deja que las placas se desarrollen durante 10-20 minutos hasta que los pocillos del testigo negativo apenas empiezan a mostrar color. A continuación, se añaden 100 μ l/pocillo de disolución de parada (H₂SO₄ 2 M) y se leen las placas en un lector de placas para ELISA a una longitud de onda de 490 nm.

Determinación de las constantes de afinidad de mAbs totalmente humanos por BIAcore

La medición de la afinidad de anticuerpos monoclonales humanos purificados, fragmentos Fab o sobrenadantes de hibridomas por resonancia de plasmones se llevó a cabo utilizando el instrumento BIAcore 2000, usando procedimientos generales esbozados por los fabricantes.

El análisis cinético de los anticuerpos se llevó a cabo usando antígenos inmovilizados en la superficie del sensor con una baja densidad. La proteína de fusión CTLA-4-Ig se inmovilizó en tres superficies del chip sensor BIAcore con una densidad que variaba de aproximadamente 390 a 900 utilizando la proteína de fusión CTLA-4-Ig en una concentración de 20 ó 50 μ g/ml en acetato sódico 10 mM, pH de 5,0, utilizando el kit para copulación de aminos

ES 2 340 745 T3

suministrado por el fabricante (BIAcore, Inc.). Se inmovilizó IgG1 (900 UR) en la cuarta superficie del chip sensor BIAcore, que fue utilizada como superficie testigo negativo para la unión inespecífica. Se llevó a cabo el análisis cinético con un caudal de 25 ó 50 microlitros por minuto y, utilizando el software proporcionado por el fabricante (BLA, evaluación 3.0), que permite cálculos Siting globales, se determinaron las velocidades de disociación (k_d o k_{off}) y asociación (k_a o k_{on}).

Ejemplo 2

Medición de la afinidad de los anticuerpos anti-CTLA-4

En la tabla siguiente se proporcionan las mediciones de afinidad para algunos de los anticuerpos seleccionados de este modo.

TABLA I

Hibridoma	Fase sólida (por BIAcore)				
	Velocidades de asociación $K_a (M^{-1}s^{-1} \times 10^6)$	Velocidades de disociación $K_d (s^{-1} \times 10^{-4})$	Constante de asociación $KA(1/M)=k_a/k_d \times 10^{10}$	Constante de disociación $KD(M)=k_d/k_a \times 10^{-10}$	Densidad superficial (UR)
Moab01	0,68	1,01	0,67	1,48	878,7
	0,70	4,66	0,15	6,68	504,5
	0,77	6,49	0,19	8,41	457,2
	0,60	3,08	0,20	5,11	397,8
4.1.1	1,85	0,72	2,58	0,39	878,7
	1,88	1,21	1,55	0,64	504,5
	1,73	1,54	1,13	0,88	457,2
	1,86	1,47	1,26	0,79	397,8
4.8.1	0,32	0,07	4,46	0,22	878,7
	0,31	0,23	1,33	0,75	504,5
	0,28	0,06	4,82	0,21	397,8
4.14.3	2,81	3,04	0,92	1,08	878,7
	2,88	3,97	0,73	1,38	504,5
	2,84	6,66	0,43	2,35	457,2
	3,17	5,03	0,63	1,58	397,8
6.1.1	0,43	0,35	1,21	0,83	878,7
	0,46	0,90	0,51	1,98	504,5
	0,31	0,51	0,61	1,63	457,2
	0,45	0,79	0,57	1,76	397,8
3.1.1	1,04	0,96	1,07	0,93	878,7
	0,95	1,72	0,55	1,82	504,5
	0,73	1,65	0,44	2,27	457,2
	0,91	2,07	0,44	2,28	397,8
4.9.1	1,55	13,80	0,11	8,94	878,7
	1,43	19,00	0,08	13,20	504,5
	1,35	20,50	0,07	15,20	397,8
4.10.2	1,00	2,53	0,39	2,54	878,7
	0,94	4,30	0,22	4,55	504,5
	0,70	5,05	0,14	7,21	457,2
	1,00	5,24	0,19	5,25	397,8

ES 2 340 745 T3

2.1.3	1,24	9,59	0,13	7,72	878,7
	1,17	13,10	0,09	11, 20	504,5
	1,11	13,00	0,09	11, 70	397,8
4.13.1	1,22	5,83	0,21	4,78	878,7
	1,29	6,65	0,19	5,17	504,5
	1,23	7,25	0,17	5,88	397,8

Como se observará, los anticuerpos preparados de acuerdo con el invento poseen elevadas afinidades y constantes de unión.

Ejemplo 3

Estructuras de anticuerpos anti-CTLA-4 preparados de acuerdo con el invento

En la siguiente discusión, se proporciona información estructural relacionada con anticuerpos preparados de acuerdo con el invento.

Con objeto de analizar las estructuras de los anticuerpos producidos de acuerdo con el invento, clonamos genes que codificaban los fragmentos de las cadenas pesada y ligera del hibridoma particular. Se llevaron a cabo la clonación génica y la secuenciación del modo siguiente:

Se aisló mRNA poli(A)⁺ de aproximadamente 2x10⁵ células de hibridoma derivadas de ratones XenoMouse inmunizados, utilizando un kit Fast-Track (Invitrogen). La generación de cDNA aleatoriamente cebado fue seguida por PCR. Se utilizaron cebadores de la región variable específica de la familia V_H humana o V_K humana [Marks *et al.*, "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes", Eur. J. Immunol. 21: 985-991 (1991)] o un cebador universal de V_H humana, MG-30 (CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG), junto con cebadores específicos para la región constante C_γ2 humana (MG-40d: 5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3') o la región constante C_κ (hκP2; como describieron previamente Green *et al.*, 1994). Se obtuvieron secuencias de transcritos de cadenas pesadas y kappa derivadas de mAbs humanos, mediante la secuenciación directa de los productos de PCR generados a partir de RNA poli(A)⁺ utilizando los cebadores anteriormente descritos. También se clonaron los productos de PCR en pCRII usando un kit de clonación TA (Invitrogen) y se secuenciaron ambas cadenas usando kits de secuenciación Prism con terminadores colorantes y un aparato ABI 377 para secuenciación. Todas las secuencias fueron analizadas mediante alineaciones con respecto al "V BASE sequence directory" (Tomlinson *et al.*, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido) usando los programas informáticos MacVector y Geneworks.

Además, se sometió cada uno de los anticuerpos 4.1.1, 4.8.1, 11.2.1 y 6.1.1 a secuenciación de DNA de longitud completa. Para dicha secuenciación, se aisló mRNA poli(A)⁺ de aproximadamente 4x10⁶ células de hibridoma usando el kit mRNA Direct (Dyna). El RNA fue inversamente transcrito usando oligo-dT (18) y el kit Advantage para RT/PCR (Clontech). Se usó la base de datos de regiones variables (V Base) para diseñar cebadores de multiplicación que comenzaran en el sitio de inicio ATG del gen DP50 de cadena pesada (5'-TATCTAAGCTCTAGACTC GACCGCCACC-ATGGAGTTTGGGCTGAGCTG-3') y hasta el codón de parada de la región constante de IgG2 (5'-TTCTTGATCAGAAATTCTATCATTTACCCGAGACAGGGAGAGCT-3'). Se añadió una secuencia Kozak óptima (ACCGCCACC) en 5' con respecto al sitio de inicio ATG. Se usó el mismo método para diseñar un cebador para el sitio de inicio ATG del gen A27 de cadena kappa (5'-TCTTCAAGCTTGCCCGGGCCCGCCACCATG GAAACCCAGCGCAG-3') y el codón de parada de la región constante kappa (5'-TTCTTTGATCAGAAATTCT CACTAACACTCTCCCTGTTGAAGC-3'). Se clonó el cDNA 012 usando un cebador para el sitio de inicio ATG (5'-TCTTCAAGCTTGCCCGGGCCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGC T-3') y el anterior cebador para el codón de parada de la región constante kappa. Los cDNAs de cadenas pesadas fueron también clonados como construcciones genómicas mediante mutagénesis dirigida al sitio, para añadir un sitio NheI al extremo del dominio J variable, y subclonando un fragmento NheI que contenía las regiones genómicas CH1/bisagra/CH2/CH3 de IgG2. La mutación puntual para generar el sitio NheI no altera la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. Se utilizaron las parejas de cebadores para multiplicar los cDNAs usando el kit Advantage High Fidelity para PCR (Clontech). Se obtuvo la secuencia del producto de PCR mediante una secuenciación directa usando kits de secuenciación con terminadores colorantes y un aparato ABI para secuenciación. Se clonó el producto de PCR en vectores de expresión de mamífero para pEE-glutamina sintetasa (Lonza) y se secuenciaron tres clones para confirmar las mutaciones somáticas. Para cada clon, se verificó la secuencia de ambas cadenas en al menos tres reacciones. Se generó un anticuerpo 4.1.1 aglicosilado por mutagénesis, dirigida al sitio, de N294Q en el dominio CH2. Se produjeron anticuerpos recombinantes por transfección transitoria de células COS7 en FCS desprovisto de IgG y se purificaron utilizando técnicas estándares con proteína A-Sepharose. Se generaron transfectantes estables por electroporación de células NSO murinas y selección en medios exentos de glutamina. El 4.1.1 recombinante, con o sin glicosilación, presentaba una especificidad y una afinidad idénticas para CTLA-4 en los ensayos ELISA y BIAcore *in vitro*.

Análisis de la utilización génica

En la tabla siguiente se expone la utilización génica evidenciada por clones hibridómicos seleccionados de anticuerpos de acuerdo con el invento.

TABLA II

Utilización de genes de cadenas pesadas y ligeras						
Clon	Cadena pesada				Cadena ligera kappa	
	VH	D	JH		VK	JK
4.1.1	DP-50	DIR4 o DIR3	JH4		A27	JK1
4.8.1	DP-50	7-27	JH4		A27	JK4
4.14.3	DP-50	7-27	JH4		A27	JK4 JK3
6.1.1	DP-50	DIR5 o DIR5rc	JH4		A27	JK3
3.1.1.	DP-50	3-3	JH6		012	JK3
4.10.2	DP-50	7-27	JH4		A27	JK3
2.1.3	DP-65	1-26	JH6		A10/A26	JK4
4.13.1	DP-50	7-27	JH4		A27	JK3
11.2.1	DP-50	D1-26	JH6		012	JK3
11.6.1	DP-50	D2-2 o D4	JH6		012	JK3
11.7.1	DP-50	D3-22 o D21-9	JH4		012	JK3
12.3.1.1	DP-50	D3-3 o DXP4	JH6		A17	JK1
12.9.1.1	DP-50	D6-19	JH4		A3/A19	JK4
4.9.1	DP-47	5-24 y/o 6-19	JH4		L5	JK1

Como se observará, se generaron anticuerpos con una fuerte tendencia a la utilización de la región variable de la cadena pesada de DP-50. Al gen DP-50 también se hace referencia como gen de la familia V_H 3-33. Sólo un anticuerpo que fue seleccionado basándose en la unión a CTLA-4 y en ensayos funcionales *in vitro* preliminares mostró una utilización de gen de cadena pesada distinta a la de DP-50. Ese clon, 2.1.3, utiliza una región variable de cadena pesada de DP-65 y tiene un isotipo IgG4. Al gen DP-65 también se hace referencia como gen de la familia V_H 4-31. Por otro lado, el clon 4.9.1, que posee una región variable de cadena pesada de DP-47, se une a CTLA-4 pero no inhibe la unión a B7-1 ni a B7-2. En ratones XenoMouse, hay más de 30 genes funcionales distintos de regiones variables de cadenas pesadas con los que generar anticuerpos. Por lo tanto, la tendencia es indicativa de un motivo ligante preferido de la interacción anticuerpo-antígeno con respecto a las propiedades combinadas de unión al antígeno y actividad funcional.

Análisis de mutaciones

Como se apreciará, el análisis de utilizaciones génicas proporciona sólo una panorámica limitada de la estructura de los anticuerpos. Puesto que las células B de los animales XenoMouse generan estocásticamente transcritos de cadenas pesadas V-D-J o ligeras kappa V-J, hay diversos procesos secundarios que tienen lugar, incluyendo, sin limitación, hipermutaciones somáticas, adiciones de nucleótidos N y extensiones de CDR3. Véanse, por ejemplo, Mendez *et al.*,

Nature Genetics 15: 146-156 (1997), y la Solicitud de Patente de EE.UU. n° de serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996. En consecuencia, para examinar más la estructura de los anticuerpos, se generaron previstas secuencias de aminoácidos de los anticuerpos a partir de los cDNAs obtenidos de los clones. Además, se obtuvieron secuencias de aminoácidos N-terminales por medio de secuenciación proteica.

La Figura 1 proporciona las secuencias de nucleótidos y las previstas secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras kappa de los clones 4.1.1 (Figura 1A), 4.8.1 (Figura 1B), 4.14.3 (Figura 1C), 6.1.1 (Figura 1D), 3.1.1 (Figura 1E), 4.10.2 (Figura 1F), 2.1.3 (Figura 1G), 4.13.1 (Figura 1H), 11.2.1 (Figura 1I), 11.6.1 (Figura 1J), 11.7.1 (Figura 1K), 12.3.1.1 (Figura 1L) y 12.9.1.1 (Figura 1M). En las Figuras 1A, 1B y 1D, se obtuvieron secuencias extendidas de los anticuerpos 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1 por clonación de longitud completa de los cDNAs, como se describió anteriormente. En dichas Figuras, la secuencia del péptido señal (o las bases que codifican la misma) se indica en negrita, y las secuencias utilizadas para la reacción PCR 5' están subrayadas.

La Figura 2 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas de los clones 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal DP-50 (3-33). Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de DP-50 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos en forma sombreada.

La Figura 3 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena pesada del clon 2.1.3 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal DP-65 (4-31). Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de DP-65 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 4 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras kappa de los clones 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 4.10.2 y 4.13.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A27. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A27 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada. Las aparentes delecciones en los CDR1s de los clones 4.8.1, 4.14.3 y 6.1.1 se indican con "0s".

La Figura 5 proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras kappa de los clones 3.1.1, 11.2.1, 11.6.1 y 11.7.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal 012. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de 012 y las secuencias de los clones se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 6 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 2.1.3 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A10/A26. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A10/A26 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 7 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 12.3.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A17. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A17 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 8 proporciona una alineación de secuencias entre la prevista secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del clon 12.9.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal A3/A19. Las diferencias entre la secuencia de la línea germinal de A3/A19 y la secuencia del clon se indican en negrita. La Figura también muestra las posiciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo en forma subrayada.

La Figura 22 proporciona una serie de secuencias adicionales de nucleótidos y aminoácidos de las siguientes cadenas de anticuerpo anti-CTLA-4:

4.1.1

cadena pesada de 4.1.1 de longitud completa [cDNA 22(a), DNA genómico 22(b) y aminoácidos 22(c)];

cadena pesada de 4.1.1 aglicosilada de longitud completa [cDNA 22(d) y aminoácidos 22(e)];

cadena ligera de 4.1.1 [cDNA 22(f) y aminoácidos 22(g)];

4.8.1

cadena pesada de 4.8.1 de longitud completa [cDNA 22(h) y aminoácidos 22(i)];

cadena ligera de 4.8.1 [cDNA 22(j) y aminoácidos 22(k)];

6.1.1

cadena pesada de 6.1.1 de longitud completa [cDNA 22(l) y aminoácidos 22(m)];

5 cadena ligera de 6.1.1 [cDNA 22(n) y aminoácidos 22(o)];

11.2.1

10 cadena pesada de 11.2.1 de longitud completa [cDNA 22(p) y aminoácidos 22(q)]; y

cadena ligera de 11.2.1 [cDNA 22(r) y aminoácidos 22(s)].

15 Las secuencias de péptidos señal se muestran en negrita y en texto grande. Los marcos de lectura abiertos de la secuencia de DNA genómico de 4.1.1 de longitud completa [Figura 22(b)] están subrayados. Y las mutaciones introducidas para preparar la cadena pesada de 4.1.1 aglicosilada y el cambio resultante (N294Q) se muestran doblemente subrayadas y con letra negrita {cDNA [Figura 22(b)] y aminoácidos [Figura 22(c)]}.

20 Ejemplo 4

Análisis de las sustituciones de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras

25 En la Figura 2, que proporciona una alineación de secuencias entre las previstas secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas de los clones 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 y 12.9.1.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal DP-50 (3-33), surge un interesante patrón. Además del hecho de la tendencia hacia DP-50 de cadena pesada en la mayoría de los clones, hay una hipermutación relativamente limitada en los anticuerpos con respecto al gen de la línea germinal DP-50. Por ejemplo, los clones 3.1.1 y 11.2.1 no tienen mutaciones. Además, las mutaciones en los otros clones son generalmente cambios conservativos que implican sustituciones de aminoácidos con propiedades similares a las de los aminoácidos de la línea germinal. Las mutaciones en muchas de las secuencias de CDR1 y CDR2 son de naturaleza particularmente conservativa. Tres de las cadenas pesadas representadas en la Figura 2, 4.10.2, 4.13.1 y 4.14.3, proceden claramente de un único proceso de recombinación (es decir, proceden de un idéntico centro terminal) y tienen unas secuencias casi idénticas. Si se consideran estas tres como una sola secuencia, entonces, entre los 10 diferentes anticuerpos que contienen la cadena pesada de DP-50, en CDR1 y CDR2 hay 3 posiciones en que un resto apolar está sustituido por otro resto apolar, 12 en que un resto polar no cargado está sustituido por otro resto polar no cargado, y 1 en que un resto polar cargado está sustituido por otro resto polar cargado. Además, hay dos posiciones en que dos restos que son estructuralmente muy similares, glicocola y alanina, están sustituidos entre sí. Las únicas mutaciones no exactamente conservativas implican tres sustituciones de un resto polar no cargado por un resto polar cargado, y una sustitución de un resto polar por un resto apolar.

Las cadenas ligeras de estos anticuerpos proceden de 5 genes Vk diferentes. El gen A27 es el más representado y es la fuente de 6 cadenas ligeras diferentes. La comparación de estas 6 secuencias revela dos características dignas de mención. En primer lugar, tres de ellas, 4.8.1, 4.14.3 y 6.1.1, contienen supresiones de uno o dos restos en CDR1, un proceso raro. En segundo lugar, hay un fuerte perjuicio para la serina de la posición seis de CDR3 de la línea germinal ya que la serina ha sido sustituida en todas las secuencias. Esto sugiere que una serina en esa posición es incompatible con la unión a CTLA-4.

Se apreciará que muchas de las sustituciones de aminoácidos anteriormente identificadas existen en íntima proximidad con, o en, una CDR. Parecería que dichas sustituciones acarrearán cierto efecto sobre la unión del anticuerpo a la molécula de CTLA-4. Además, dichas sustituciones podrían ejercer un efecto significativo sobre la afinidad de los anticuerpos.

55 Ejemplo 5

Análisis de las secuencias de aminoácidos N-terminales de anticuerpos de acuerdo con el invento

60 Con objeto de verificar adicionalmente la composición y la estructura de los anticuerpos de acuerdo con el invento, anteriormente identificados, secuenciamos algunos de los anticuerpos utilizando un secuenciador Perkin-Elmer. Se aislaron tanto las cadenas pesadas como las ligeras kappa de los anticuerpos, se purificaron mediante el uso de técnicas de electroforesis preparativa en gel y electrotransferencia y luego se secuenciaron directamente del modo descrito en el Ejemplo 6. Una mayoría de las secuencias de cadena pesada fueron bloqueadas por su extremo amínico. Por lo tanto, dichos anticuerpos fueron tratados primero con piroglutamato aminopeptidasa y fueron luego secuenciados.

65 Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 9. La Figura 9 también proporciona el peso molecular de las cadenas pesadas y ligeras, según se determina mediante espectroscopia de masas (MALDI).

Ejemplo 6

Caracterización adicional de anticuerpos

- 5 La Figura 10 proporciona cierta información caracterizadora adicional acerca de ciertos anticuerpos. En la Figura, se resumen datos relacionados con los clones 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.14.3 y 6.1.1. Se proporcionan los datos siguientes: concentración, enfoque isoeléctrico (IEF), SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño, FACS, espectroscopia de masas (MALDI) y secuencias N-terminales de cadenas ligeras.
- 10 Generalmente, los datos se generaron del modo siguiente:

Materiales y métodos

- 15 La *concentración proteica* se determinó a 280 nm a partir de un barrido UV (200-350 nm), en el que 1,58 unidades de absorbancia a 280 nm equivalen a 1 mg/ml.

- La *SDS-PAGE* se llevó a cabo usando el sistema de electroforesis Novex NuPAGE con un gel NuPAGE al 10% y un tampón de desarrollo MES. Se prepararon las muestras diluyendo 3:1 con tampón de muestras NuPAGE 4x ($\pm$ beta-mercaptoetanol) calentado y se cargaron $\sim 5 \mu\text{g}$ de proteína en el gel. Luego se tiñó el gel con disolución tintórea Brilliant Blue R (Sigma, n° B-6529 del catálogo) y se hicieron estimaciones del peso molecular comparando las bandas teñidas con "Perfect Protein Markers" (Novagen, n° 69149-3 del catálogo).
- 20

- Para la *secuenciación N-terminal*, las muestras fueron desarrolladas como antes en geles NuPAGE, transferidas a una membrana de inmovilización Pro Blot (Applied Biosystems) y luego teñidas con Coomassie Blue R-250. Las bandas proteicas teñidas fueron escindidas y fueron sometidas a un análisis secuencial mediante la degradación de Edman automatizada en un secuenciador Applied Biosystems 494 Precise HT.
- 25

- El *enfoque isoeléctrico* (IEF) se llevó a cabo utilizando geles Pharmacia IEF 3-9 Phast (n° 17-0543-01 del catálogo). Se diluyeron las muestras en glicerol al 10% hasta $\sim 0,8 \text{ mg/ml}$, se cargó $1 \mu\text{l}$ en el gel y luego se tiñó con plata. Las estimaciones del pI se realizaron comparando las bandas teñidas con una gran variedad (pH de 3-10) de patrones para IEF (Pharmacia, n° 17-0471-01 del catálogo).
- 30

- La *cromatografía de exclusión por tamaño* (SEC) se llevó a cabo en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), en el sistema Pharmacia SMART, usando la columna Superdex 75 PC 3.2/30. Las estimaciones de peso molecular se realizaron comparando los tiempos de retención de los picos con los tiempos de retención en el gel.
- 35

- Para los *estudios por FACS*, se prepararon células T periféricas humanas y se estimularon durante 48 horas. Las células T fueron lavadas una vez, resuspendidas en tampón de FACS en una concentración de 1×10^6 células/ $100 \mu\text{l}$ y teñidas para la expresión superficial de CD3 con $10 \mu\text{l}$ de anti-CD3-FITC (Immunotech, Marsella, Francia) durante 30 minutos a temperatura ambiental. Las células fueron lavadas dos veces y fueron luego fijadas, permeabilizadas ("Fix and Perm", Caltag) y teñidas para la expresión de CTLA-4 intracelular con $10 \mu\text{l}$ de anti-CD152-PE (Pharmingen). La citometría de flujo se llevó a cabo usando un aparato Becton Dickinson FACSort. Se ajustaron los cuadrantes mediante el análisis de relevantes anticuerpos testigo de isotipo (Caltag).
- 40

- Como se discutió anteriormente, se ha demostrado que los anticuerpos anti-CTLA-4 poseen ciertas potentes actividades de modulación inmune. Se llevaron a cabo los experimentos siguientes con objeto de determinar si los anticuerpos de acuerdo con el presente invento poseían dichas actividades. En general, los experimentos se diseñaron para evaluar la capacidad de los anticuerpos para inhibir la interacción entre moléculas de CTLA-4 y B7, ser selectivos entre CD28 y las moléculas de CTLA-4 y B7, y activar la producción de citocinas de células T, incluyendo, pero sin limitarse a, la expresión de IL-2 y/o IFN- γ . Además, se emprendió el examen de la reactividad cruzada de los anticuerpos del invento con ciertos tejidos humanos y moléculas de CTLA-4 de otras especies (por ejemplo, ratón y primate).
- 45
- 50

Ejemplo 7

ELISA de competición: Inhibición de la interacción CTLA-4/B7-1 o B7-2 por anticuerpos de acuerdo con el invento

- Se llevó a cabo un ensayo *in vitro* para determinar si anticuerpos de acuerdo con el presente invento eran capaces de inhibir la unión de CTLA-4 con B7-1 o B7-2. Como se apreciará, se esperaba que los anticuerpos del invento que fuesen capaces de inhibir la unión de CTLA-4 con moléculas de B7 fueran candidatos a la regulación inmune a través de la ruta de CTLA-4. En el ensayo, se utilizaron los siguientes materiales y métodos.
- 60

Materiales y métodos

- Se revistieron placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca, número 439454) con B7-1-Ig(G1) o B7-2-Ig(G1) (Repligen, Inc., Needham, Massachusetts, EE.UU.) 3 nM en PBS de Dulbecco y se incubaron a 4°C durante la

noche. El día 2, se retiró la B7-Ig y se bloquearon las placas con BSA al 1% más Tween-20 al 0,05% en D-PBS durante dos horas. Se lavaron 3 veces las placas con tampón de lavado (Tween-20 al 0,05% en D-PBS). Se premezclaron el anticuerpo, en las concentraciones de ensayo apropiadas, y CTLA-4-Ig(G4) (concentración final de 0,3 nM) (Repligen, Inc., Needham, Massachusetts, EE.UU.) durante 15 minutos y luego se añadió la mezcla a la placa revestida con B7-Ig (volumen total de 60 μ l) y se incubó a temperatura ambiental durante 1,5 horas. Se lavaron las placas 3 veces, se añadieron 50 μ l de una dilución 1 a 1000 de anticuerpo anti-IgG4 humana generado en ratón y marcado con HRP (Zymed, San Francisco, California, EE.UU., n° 05-3820) y se incubó a temperatura ambiental durante 1 hora. Se lavaron las placas 3 veces, se añadieron 50 μ l de sustrato TMB Microwell para peroxidasa (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, Maryland, EE.UU., n° 50-76-04), se incubó a temperatura ambiental durante 20 minutos y luego se añadieron 50 μ l de H₂SO₄ 1 N a las placas. Se leyeron las placas a 450 nm usando un lector de placas de Molecular Devices (Sunnyvale, California, EE.UU.). Todas las muestras se ensayaron por duplicado. Se definió la señal máxima como la unión de CTLA-4-Ig en ausencia de anticuerpo de ensayo. Se definió la unión inespecífica como la absorbancia en ausencia de CTLA-4-Ig y anticuerpo de ensayo.

Los resultados del ensayo se proporcionan en las Tablas IIIA y IIIB. En la Tabla IIIA se muestran los resultados para una diversidad de anticuerpos. En la Tabla IIIB se muestran los resultados de un experimento distinto en que se compara el anticuerpo 4.1.1 con el anticuerpo 11.2.1 del invento.

TABLA IIIA

Clon de CTLA-4-Ig	Isotipo	ELISA competitivo para CTLA-4/B7-2 IC50 (nM)	ELISA competitivo para CTLA-4/B7-1 IC50 (nM)
CT3.1.1	IgG2	0,45 $\pm$ 0,07 (n=3)	0,63 $\pm$ 0,10 (n=2)
CT4.1.1	IgG2	0,38 $\pm$ 0,06 (n=5)	0,50 $\pm$ 0,05 (n=2)
CT4.8.1	IgG2	0,57 $\pm$ 0,03 (n=3)	0,17 $\pm$ 0,28 (n=2)
CT4.9.1	IgG2	no competitivo (n=3)	no competitivo (n=2)
CT4.10.2	IgG2	1,50 $\pm$ 0,37 (n=3)	3,39 $\pm$ 0,31 (n=2)
CT4.13.1	IgG2	0,49 $\pm$ 0,05 (n=3)	0,98 $\pm$ 0,11 (n=2)
CT4.14.3	IgG2	0,69 $\pm$ 0,11 (n=3)	1,04 $\pm$ 0,15 (n=2)
CT6.1.1	IgG2	0,39 $\pm$ 0,06 (n=3)	0,67 $\pm$ 0,07 (n=2)

TABLA IIIB

Clon de CTLA-4-Ig	Isotipo	ELISA competitivo para CTLA-4/B7-2 IC50 (nM)	ELISA competitivo para CTLA-4/B7-1 IC50 (nM)
CT4.1.1	IgG2	0,55 $\pm$ 0,08 (n=4)	0,87 $\pm$ 0,14 (n=2)
CT11.2.1	IgG2	0,56 $\pm$ 0,05 (n=4)	0,81 $\pm$ 0,24 (n=2)

Ejemplo 8

Relaciones de selectividad de anticuerpos del invento con respecto a CTLA-4 frente a CD28 o B7-2

Se llevó a cabo otro ensayo *in vitro* para determinar la selectividad de anticuerpos del invento con respecto a CTLA-4 frente a CD28 o B7-2. En relación con los experimentos, se utilizaron los materiales y métodos siguientes.

ELISA de selectividad para CTLA-4: Materiales y métodos

Se revistió una placa Floro-NUNC (Nunc, número 475515 del catálogo), de 96 pocillos, con cuatro antígenos: CTLA-4/Ig, CD44/Ig, CD28/Ig y B7-2/Ig (antígenos generados de forma doméstica). Se revistió la placa durante la noche, a +4°C, con los antígenos en una concentración de 1 μ g/ml, 100 μ l/pocillo, en tampón de bicarbonato sódico 0,1 M, pH de 9,6. Luego se lavó la placa con PBST (PBS + Tween-20 al 0,1%) tres veces utilizando un lavador

ES 2 340 745 T3

de placas NUNC. La placa fue bloqueada con PBST + BSA al 0,5% en una cantidad de 150 μ l/pocillo. La placa fue incubada a temperatura ambiental durante 1 hora y fue luego lavada tres veces con PBST. A continuación, se diluyeron los anticuerpos anti-CTLA-4 del invento en bloque, a una concentración de 1 μ g/ml, y se añadieron a la placa. La placa fue incubada a temperatura ambiental durante 1 hora y fue luego lavada tres veces con PBST. Los pocillos que contenían los anticuerpos del invento fueron luego tratados en bloque con 100 μ l/pocillo de anti-IgG2 humana-HRP (Southern Biotech, número 9070-05 del catálogo) en una dilución 1:4000. Además, una fila fue tratada con anti-IgG humana (Jackson, número 209-035-088 del catálogo) para normalizar el revestimiento de la placa. Se diluyó este anticuerpo hasta 1:5000 en bloque y se añadió en una cantidad de 100 μ l/pocillo. Además, una fila fue tratada con anti-CTLA-4 humano-HRP (Pharmingen, número 345815 del catálogo/conjugado con HRP de encargo) como un testigo positivo. Este anticuerpo fue utilizado en una concentración de 0,05 μ g/ml, diluido en bloque. La placa fue incubada a temperatura ambiental durante 1 hora y fue luego lavada tres veces con PBST. Se añadió sustrato quimioluminiscente LBA (Pierce) en una cantidad de 100 μ l/pocillo y se incubó la placa durante 5 minutos en un sacudidor de placas. Luego se leyó la placa utilizando un aparato Lumi-Imager para una exposición de 2 minutos.

Ensayo IGEN de selectividad de unión de CTLA-4-Ig: Materiales y métodos

Se lavaron Dynabeads M-450 (Dynal A.S., Oslo, Noruega, n° 140.02) 3 veces con tampón de fosfato sódico, pH de 7,4, y se resuspendieron en tampón de fosfato sódico. Se añadieron 1,0 μ g de CTLA-4-Ig(G1), 1,0 μ g de CD28-Ig(G1) o de 1,0 a 3,0 μ g de B7-2-Ig(G1) (Repligen, Inc., Needham, Massachusetts, EE.UU.) a 100 μ l de glóbulos y se incubó la mezcla durante la noche en un agitador giratorio a 4°C. El día 2, los glóbulos fueron lavados 3 veces en BSA al 1% más Tween-20 al 0,05% en PBS de Dulbecco y fueron bloqueados durante 30 minutos. Se diluyeron los glóbulos 1 a 10 con tampón de bloqueo y se añadieron 25 μ l de los glóbulos revestidos a tubos de polipropileno de 12 x 75 mm. Todas las muestras se ensayaron por duplicado. Se añadieron 50 μ l de anticuerpo de ensayo (concentración final de 1 μ g/ml) o de tampón de bloqueo a los tubos y se incubaron durante 30 minutos en el carrusel del Analizador Origen 1.5 (IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) a temperatura ambiental mientras se revolvió a 100 rpm. Se añadieron 25 μ l de anti-IgG1, IgG2 o IgG4 humanas, de origen murino y rutenilado (Zymed, Inc., San Francisco, California, EE.UU., números 05-3300, 05-3500 y 05-3800) (concentración final de 3 μ g/ml en un volumen total de 100 μ l), a los tubos. Se incubaron los tubos durante 30 minutos a temperatura ambiental en el carrusel mientras se revolvió a 100 rpm. Se añadieron 200 μ l de tampón de ensayo Origen (IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland, EE.UU., n° 402-050-03) por tubo, se revolvió brevemente y luego se contaron los tubos en el Analizador Origen y se determinaron las unidades de ECL (electroquimioluminiscencia) de cada tubo. Se determinaron factores de normalización para corregir las diferencias en la unión de las proteínas de fusión a los Dynabeads, y se corrigieron las unidades de ECL en cuanto a la unión inespecífica antes de calcular las relaciones de selectividad.

Los resultados de los ensayos se proporcionan en las Tablas IVA y IVB.

TABLA IVA

Clon	Isotipo	ELISA para CTLA-4/CD28	ELISA para CTLA-4/B7-2	ELISA para CTLA-4/CD44	IGEN para CTLA-4/CD28	IGEN para CTLA-4/B7-2
3.1.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=1) 195:1 (n=1)
4.1.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2) 485:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1) 261:1 (n=1)	>500:1 (n=1) 107:1 (n=1)
4.8.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2) 190:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=2)
4.9.1	IgG2	>500:1 (n=2) 244:1 (n=1)	>500:1 (n=2) 33:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1)	>500:1 (n=1)
4.10.2	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1)	>500:1 (n=1)
4.13.1	IgG2	>500:1 (n=2) 46:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=1) 329:1 (n=1)	>500:1 (n=2)
4.14.3	IgG2	>500:1 (n=2) 80:1 (n=1)	>500:1 (n=2) 10:1 (n=1)	>500:1 (n=2) 126:1 (n=1)	>413:1 (n=1)	>234:1 (n=1)
6.1.1	IgG2	>500:1 (n=2) 52:1 (n=1)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=2)

ES 2 340 745 T3

TABLA IVB

Clon	Isotipo	ELISA para CTLA-4/CD26	ELISA para CTLA-4/B7-2	ELISA para CTLA-4/hlgG
4.1.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=2)	>500:1 (n=3)
11.2.1	IgG2	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)	>500:1 (n=3)

Ejemplo 9

Modelo de señal de células T humanas

Con objeto de definir más la actividad de los anticuerpos de acuerdo con el invento para actuar como reguladores inmunes, desarrollamos ciertos ensayos con células T para cuantificar la potenciación de la producción de IL-2 por células T tras el bloqueo de la señal de CTLA-4 con los anticuerpos. En relación con los experimentos, se utilizaron los materiales y métodos siguientes.

Materiales y métodos

Se prepararon células T humanas recién aisladas utilizando Histopaque (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU., n° A-70543) y T-Kwik (Lympho-Kwik, One Lambda, Canoga Park, California, EE.UU., n° LK-50-T), se estimularon con PHA (fitohemaglutinina purificada, Murex Diagnostics, Ltd., Dartford, Inglaterra, n° HA 16) (1 µg/ml) en medio (RPMI-1640 que contenía L-glutamina, aminoácidos no esenciales MEM, penicilina, estreptomycin, HEPES 25 mM y FBS al 10%), en una concentración de 1x10⁶ células/ml, y se incubaron a 37°C durante 2 días. Se lavaron las células y se diluyeron en medio hasta 2x10⁶ células/ml. Se trataron células Raji (linfoma de Burkitt, ATCC humano n° CCL 86 Clase II, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU.) con mitomicina C (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU., n° M-4287; 25 µg/ml) durante una hora a 37°C. Las células Raji fueron lavadas 4 veces en PBS y fueron resuspendidas hasta 2x10⁶ células/ml. Se añadieron blastos de células T humanas (5x10⁵/ml), células Raji (5x10⁵/ml) y anticuerpos anti-CTLA-4 o un anticuerpo testigo isotópicamente correspondiente, en diversas concentraciones, a placas de 96 pocillos para microtitulación y se incubaron las placas a 37°C durante 72 horas. El volumen total por pocillo fue 200 µl. Setenta y dos horas después de la estimulación, las placas fueron centrifugadas y el sobrenadante fue separado y congelado para la posterior determinación de IL-2 (kit de ELISA Quantikine para IL-2, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EE.UU., n° D2050) e IFN-γ (kit de ELISA Quantikine para IFN-γ, R&D Systems). Se definió la potenciación citocínica como la diferencia entre los niveles de citocinas en los cultivos que contenían un mAb bloqueante anti-CTLA-4 y los de aquellos que contenían un anticuerpo testigo isotópicamente correspondiente. Para los experimentos por citometría de flujo, las células Raji se lavaron 1 vez con tampón de FACS (PBS que contenía FCS térmicamente inactivado al 2% y azida sódica al 0,025%). Los sedimentos celulares fueron resuspendidos en tampón de FACS en una concentración de 1x10⁶ células/100 µl y fueron incubados con 10 µl de anti-CD80-PE (Becton Dickinson, San Jose, California, EE.UU.) o anti-CD86-PE (Pharmingen, San Diego, California, EE.UU.) durante 30 minutos a temperatura ambiental. Las células fueron lavadas dos veces y fueron resuspendidas en 1 ml de tampón de FACS. Se llevó la citometría de flujo a cabo usando un aparato Becton Dickinson FACSort. Se ajustaron los marcadores de histograma mediante el análisis de relevantes anticuerpos testigo de isotipo (Caltag, Burlingame, California, EE.UU.).

En general, hemos desarrollado un ensayo que puede ser usado para una rápida determinación de la suprarregulación de IL-2 de células T. Como se apreciará, la estimulación de las células T depende de B7 y CD28. Además, los blastos T lavados no crean IL-2 detectable, y las células Raji no crean IL-2 detectable ni siquiera cuando son estimuladas con LPS o PWM. Sin embargo, en combinación, los blastos T conjuntamente cultivados con células Raji pueden modelar los procesos de señalización de B7, CTLA-4 y CD28 y se pueden evaluar los efectos de anticuerpos contra ellos.

La Figura 11 muestra la expresión de B7-1 y B7-2 en células Raji al usar los mAbs anti-CD80-PE y anti-CD86-PE, usando la citometría de flujo (FACS) del modo descrito en el Ejemplo 6.

La Figura 12 muestra la potenciación, dependiente de la concentración, de la producción de IL-2 en el ensayo con blastos de células T/Raji, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 [BNI3 (Pharmingen) y los anticuerpos 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1 del invento].

La Figura 13 muestra la potenciación, dependiente de la concentración, de la producción de IFN-γ en el ensayo con blastos de células T/Raji, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 [BNI3 (Pharmingen) y los anticuerpos 4.1.1, 4.8.1 y 6.1.1 del invento] (mismas células T de donante).

ES 2 340 745 T3

La Figura 14 muestra la potenciación media de la producción de IL-2 en células T de 6 donantes, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 en el ensayo con blastos de células T/Raji. Es interesante considerar que el mAb CT4.9.1 se une a CTLA-4 pero no bloquea la unión de B7. Por lo tanto, la simple unión a CTLA-4 es en sí insuficiente para proporcionar un anticuerpo funcional del invento.

La Figura 15 muestra la potenciación media de la producción de IFN- γ en células T de 6 donantes, inducida por anticuerpos bloqueantes anti-CTLA-4 en el ensayo con blastos de células T/Raji.

La Figura 19 muestra una comparación entre los anticuerpos 4.1.1 y 11.2.1 del invento en una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ en el ensayo de 72 horas con blastos de células T/Raji, como se describe en este Ejemplo 9, y el ensayo con Superantígeno descrito en el Ejemplo 10.

La Figura 20 muestra la potenciación, dependiente de la concentración, de la producción de IL-2 inducida por los anticuerpos anti-CTLA-4 4.1.1 y 11.2.1 del invento en el ensayo con blastos de células T/Raji.

La Tabla IVC siguiente proporciona información relativa a la potenciación media y el intervalo de potenciación de la respuesta citocínica en los ensayos con Raji y SEA del invento. Cada uno de los experimentos incluidos en los resultados se basa en anticuerpo en una dosis de 30 $\mu\text{g/ml}$ y se mide a las 72 horas. Se muestran el número de donantes usados en los experimentos y también las respuestas.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA IVC

Ensayo	mAb	Citocina	Potenciación media (pg/ml)	SEM	Intervalo de potenciación (pg/ml)	n	Respuesta de donantes
Blastos de células T/Raji	4.1.1	IL-2	3329	408	0 a 8861	42	19 de 21
Blastos de células T/Raji	4.1.1	IFN- γ	3630	980	600 a 13.939	17	13 de 13
Blastos de células T/Raji	11.2.1	IL-2	3509	488	369 a 6424	18	14 de 14
SEA (PBMC)	4.1.1	IL-2	2800	312	330 a 6699	42	17 de 17
SEA (PBMC)	11.2.1	IL-2	2438	366	147 a 8360	25	15 de 15
SEA (sangre completa)	4.1.1	IL-2	6089	665	-168 a 18.417	46	15 de 17
SEA (sangre completa)	11.2.1	IL-2	6935	700	-111 a 11.803	25	12 de 14

Ejemplo 10

Modelo de señales de células T humanas

5 Desarrollamos un segundo ensayo celular con objeto de cuantificar la potenciación de la suprarregulación de IL-2 en células T tras el bloqueo de la señal de CTLA-4 con los anticuerpos. En relación con los experimentos, se utilizan los siguientes materiales y métodos.

10 *Materiales y métodos*

Se prepararon PBMCs humanos usando el sistema Accuspin. Se revistieron previamente placas de microtitulación con un anticuerpo anti-CD3 (Leu4, Becton Dickinson; 60 ng/ml) y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Se añadieron las hPBMCs a los pocillos en una cantidad de 200.000 células por pocillo. Se añadió enterotoxina estafilocócica A (SEA; del inglés, *Staphylococcus enterotoxin A*) (Sigma) a los pocillos en una concentración de 100 ng/ml. Se añadieron los anticuerpos a los pocillos, normalmente en una concentración de 30 µg/ml. Luego se estimularon las células durante 48, 72 ó 96 horas. Se centrifugaron las placas en el punto temporal deseado y se retiraron los sobrenadantes de los pocillos. A continuación, se examinaron los sobrenadantes en cuanto a la producción de IL-2 utilizando un ELISA (R&D Systems).

20 Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 16, 17 y 21. En la Figura 16, se midió la inducción de la producción de IL-2 en hPBMCs de 5 donantes 72 horas después de la estimulación. En la Figura 17, se muestran los resultados de la medición en sangre completa, analizándose la diferencia en la inducción de la producción de IL-2 en la sangre de 3 donantes, según se mide a las 72 y 96 horas después de la estimulación.

25 En la Figura 21, se muestra la potenciación de la producción de IL-2 en la sangre completa de 2 donantes, según se mide a las 72 horas después de la estimulación.

Ejemplo 11

30 *Modelo tumoral en animal*

Hemos establecido un modelo tumoral en animal para el análisis *in vivo* de anticuerpos anti-CTLA-4 murino en cuanto a la inhibición del crecimiento tumoral. En el modelo, se desarrolla un tumor de fibrosarcoma murino y se tratan los animales con anticuerpos anti-CTLA-4 murino. A continuación se proporcionan los materiales y métodos para el establecimiento del modelo.

Materiales y métodos

40 Se inyectaron subcutáneamente 0,2 ml de células tumorales Sa1N (1×10^6) (Baskar, 1995) en la cara dorsal del cuello de hembras de ratón A/J (6-8 semanas de edad). Los días 0, 4, 7 y 14 después de la inyección de las células tumorales, se inyectó intraperitonealmente un anticuerpo anti-CTLA-4 murino o un anticuerpo testigo isotópicamente correspondiente (Pharmingen, San Diego, California, EE.UU.; 200 µg/animal). Se realizaron mediciones tumorales en el curso de los experimentos de 3-4 semanas utilizando un calibre electrónico Starret SPC Plus (Athol, Massachusetts, EE.UU.) y se expresó el tamaño tumoral como el área superficial cubierta por el crecimiento tumoral (mm²).

La Figura 18 muestra la inhibición del crecimiento tumoral con un anticuerpo anti-CTLA-4 murino en un modelo tumoral de fibrosarcoma murino. Como se muestra en la Figura 18, los animales tratados con anti-CTLA-4 presentaban una reducción del crecimiento tumoral en comparación con los animales tratados con un anticuerpo testigo de isotipo. En consecuencia, los mAbs anti-CTLA-4 murino eran capaces de inhibir el crecimiento de un fibrosarcoma en un modelo tumoral en ratón.

Se espera que los anticuerpos que presenten reactividad cruzada con CTLA-4 murino se comporten similarmente en el modelo. Sin embargo, de los anticuerpos del invento que han sido examinados en cuanto a reactividad cruzada, ninguno presenta reactividad cruzada con CTLA-4 murino.

Ejemplo 12

60 *Modelo tumoral en animal*

Con objeto de investigar adicionalmente la actividad de los anticuerpos de acuerdo con el invento, se diseñó un modelo de xenoinjerto en ratón SCID para ensayar la erradicación de tumores establecidos y sus metástasis derivadas. En el modelo, se proporcionan ratones SCID con células T humanas injertadas y se les implantan células de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCC; del inglés, *non-small cell cancer*) o carcinoma colorrectal (CC) derivadas del paciente. La implantación se realiza en las almohadillas grasas gonadales de los ratones SCID. Los tumores son dejados crecer y son luego extirpados. Los ratones desarrollan metástasis hepáticas y tumores de tipo humano. Dicho modelo es descrito por Bumpers *et al.*, J. Surgical Res 61: 282-288 (1996).

ES 2 340 745 T3

Se espera que los anticuerpos del invento inhiban el crecimiento de tumores formados en dicho ratones.

Alegre et al., *J. Immunol.* 157:4762-70 (1996).

Allison and Krummel, *Science* 270:932-933 (1995).

Balzano et al., *Int. J. Cancer Suppl.* 7:28-32 (1992).

Blair et al., *J. Immunol.* 160:12-5 (1998).

Blake and Litzi-Davis, *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992).

Boussiotis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11059-63 (1993).

Bowie et al., *Science* 253:164 (1991).

Bruggeman et al., *PNAS USA* 86:6709-6713 (1989).

Bruggeman, M. and Neuberger, M.S., in *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 2:159-165 (Lerner et al., eds., *Academic Press* (1991)).

Bruggeman et al., "Human antibody production in transgenic mice: expression from 100 kb of the human IgH locus", *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326 (1991).

Bruggeman, M. and Neuberger, M.S., "Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice", *Immunology Today* 17:391-397 (1996).

Brunet et al., *Nature* 328:267-270 (1987).

Bumpers et al., *J. Surgical Res.* 61:282-288 (1996).

Capsey et al., *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988)).

Castan et al., *Immunology* 90:265-71 (1997).

Cepero et al., *J. Exp. Med.* 188:199-204 (1998).

Chen et al., "Immunoglobulin gene rearrangement in B-cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus", *International Immunology* 5:647-656 (1993).

Chen et al., *Cell* 71:1093-1102 (1992).

Chen et al., *Human Gene Therapy* 5:95-601 (1994).

Chiswell and McCafferty, *TIBTECH* 10:80-84 (1992).

Choi et al., "Transgenic mice containing a human heavy chain Immunoglobulin gene fragment cloned in a yeast artificial chromosome", *Nature Genetics* 4:117-123 (1993).

Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).

Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).

Chuang et al., *J. Immunol.* 159:144-151 (1997).

Coligan et al., Unit 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays", in *Current protocols in immunology* (1994).

Cwirla et al., *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990).

Dariavach et al., *Eur. J. Immunol.* 18:1901-1905 (1988).

Dayhoff, M.O., in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp. 1-10.

de Boer et al., *Eur. J. Immunol.* 23:3120-5 (1993).

Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991).

Evans et al., *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987).

Fallarino et al., *J. Exp. Med.* 188:205-10 (1998).

5 **Fanger et al.**, *Immunol. Methods* 4:72-81 (1994).

Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1985).

10 **Fishwild et al.**, "High-avidity human IgG γ monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice", *Nature Biotech.* 14:845-851 (1996).

Freeman et al., *J. Exp. Med.* 178:2185-92 (1993).

15 **Freeman et al.** *J. Immunol.* 161:2708-15 (1998).

Freeman et al., *Science* 262:907-9 (1993).

Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

20 **Galfre**, G. and **Milstein**, C.; "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures", *Methods Enzymol.* 73:3-46 (1981).

Gorman et al., *P.N.A.S.* 79:6777 (1982).

25 **Green** and Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998).

Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994).

Grosschedl et al., *Cell* 41:885 (1985).

30 **Hanes and Pluthau**, *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997).

Harding et al., *Nature* 356:607-609 (1994).

35 **Harper et al.**, *J. Immunol.* 147:1037-44 (1991).

Hathcock et al., *Science* 262:905-7 (1993).

Hoganboom et al., *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992).

40 **Horspool et al.**, *J. Immunol.* 160:2706-14 (1998).

Houghten et al., *Biotechniques* 13:412-421 (1992).

45 **Houghten**, *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985).

Hurwitz et al., *J. Neuroimmunol.* 73:57-62 (1997).

Hurwitz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95:10067-71 (1998).

50 Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)).

55 **Jakobovits et al.**, "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial-chromosome" *Nature* 362:255-258 (1993).

60 **Jakobovits**, A. et al., "Analysis of homozygous mutant chimeric mice: Deletion of the immunoglobulin heavy-chain joining region blocks B-cell development and antibody production" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555 (1993),

Jakobovits, A., "Humanizing the mouse genome" *Current Biology* 4:761-763 (1994).

65 **Jakobovits**, A., "Production of fully human antibodies by transgenic mice" *Current Opinión in Biotechnology* 6:561-566 (1995).

ES 2 340 745 T3

Junghans et al., in *Cáncer Chemotherapy and Biotherapy*, 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., *Lippincott Raven* (1996)).

Kabat et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, N.I.H. Publication No.91-3242.

Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1987 and 1991)).

Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992).

Krummel and Allison, *J. Exp. Med.* 182:459-65 (1995).

Krummel et al., *Int. Immunol.* 8:519-23 (1996).

Kuchroo et al., *Cell* 80:707-18 (1995).

Kwon et al., *PNAS USA* 94: 8099-103 (1997).

LaPlanche et al., *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986).

Lenschow et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11054-8 (1993).

Lenschow et al., *Science* 257:789-792 (1992).

Lin et al., *J. Exp. Med.* 188:199-204 (1998).

Linsley et al., *J. Exp. Med.* 176:1595-604 (1992).

Linsley et al., *J. Exp. Med.* 174:561-569 (1991).

Linsley et al., *Science* 257:792-795 (1992).

Liu et al., *J. Immunol.* 139:3521 (1987).

Liu et al., *P.N.A.S.* 84:3439 (1987).

Lonberg et al., "Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications" *Nature* 368:856-859 (1994).

Luhder et al., *J. Exp. Med.* 187:427-32 (1998).

Marasco, *Gene Therapy* 4:11-15 (1997).

Markees et al., *J. Clin. Invest.* 101:2446-55 (1998).

Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes" *Eur. J. Immunol.* 21:985-991 (1991).

McCoy et al., *J. Exp. Med.* 186:183-7 (1997).

Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997).

Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970).

Okayama et al., *Mol. Cell. Biol.* 3:280 (1983).

Parmley and Smith, *Gene* 73:305-318 (1988).

Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988).

Pérez et al., *Immunity* 6:411-7 (1997).

Perrin et al., *Immunol Res* 14:189-99 (1995).

Perrin et al., *J. Immunol.* 157:1333-6 (1996).

Pinalla et al., *Biotechniques* 13:901-905 (1992).

ES 2 340 745 T3

Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. *Freeman and Company*, New York (1984)).

Razi-Wolf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11182-6 (1993).

5 Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularly Chapter 87 by Blaug, Seymour.

Rizo and Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992).

10 **Russel et al.**, *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993).

Schwartz, *Cell* 71:1065 (1992).

Scott, *TIBS* 17:241-245 (1992).

15 **Smith and Waterman**, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981).

Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990).

20 **Stec et al.**, *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984).

Stein et al., *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988).

25 **Taylor et al.**, "A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins" *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295 (1992).

Taylor et al., "Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutations and class switching in mice that lack endogenous IgM". *International Immunology* 6:579-591 (1994).

30 The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed.; McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991).

Tivol et al., *Immunity* 3:541-7 (1995).

35 **Townsend and Allison**, *Science* 259:368 (1993).

Traunecker et al., *Int. J. Cancer* (Suppl.) 7:51-52 (1992).

40 **Tuailon et al.**, "Analysis of direct and inverted DJH rearrangements in a human Ig heavy chain transgenic minilocus", *J. Immunol.* 154:6453-6465 (1995).

Tuailon et al., "Human immunoglobulin heavy-chain minilocus recombination in transgenic mice: gene-segment use in μ . and γ transcripts" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724 (1993).

45 **Uhlmann and Peyman**, *Chemical Reviews* 90:543 (1990).

Van **Parijs et al.**, *J. Exp. Med.* 186:1119-28 (1997).

50 **Veber and Freidinger**, *TINS* p.392 (1985).

Vitetta, *Immunol Today* 14:252 (1993).

Walunas et al., *Immunity* 1:405-13 (1994).

55 **Walunas et al.**, *J. Exp. Med.* 183:2541-50 (1996).

Waterhouse et al., *Science* 270:985-988 (1995).

60 **Winter and Harris**, *Immunol. Today* 14:43-46 (1993).

Wright et al., *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992).

Yang et al., *Cáncer Res* 57:4036-41 (1997).

65 **Yi-qun et al.**, *Int. Immunol.* 8:37-44 (1996).

Zon et al., *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991).

ES 2 340 745 T3

Zon et al., *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford-University Press, Oxford England (1991)).

Fry et al., "Specific, irreversible inactivation of the epidemial growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95:12022-7 (1998).

Hoffman et al., "A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain", *J. Mol. Biol.* 282:195-208 (1998).

Ginalski et al., "Modelling of active forms of protein kinases: p38-a case study", *Acta Biochim. Pol.* 44:557-64 (1997).

Jouko et al., "Identification of csk tyrosine phosphorylation sites and a tyrosine residue important for kinase domain structure", *Biochem. J.* 322:927-35 (1997).

Singh et al., "Structure-based design of a potent, selective, and irreversible inhibitor of the catalytic domain of the erbB receptor subfamily of protein tyrosine kinases", *J. Med. Chem.* 40:1130-5 (1997).

Mandel et al., "ABGEN: A knowledge-based automated approach for antibody structure modeling", *Nat. Biotechnol.* 14:323-8 (1996).

Monfardini et al., "Rational design, analysis, and potential utility of GM-CSF antagonists", *Proc. Assoc. Am. Physicians* 108:420-31 (1996).

Furet et al., "Modelling study of protein kinase inhibitors: binding mode of staurosporine and origin of the selectivity of CGP 52411", *J. ComputAided Mol. Des* 9:465-72 (1995).

Ill et al., "Design and construction of a hybrid Immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions", *Protein Eng.* 10:949-57 (1997).

Martin et al., "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6", *EMBO J.* 13:5303-9 (1994).

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/466.008, presentada el 12 de Enero de 1990

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/574.748, presentada el 29 de Agosto de 1990

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/575.962, presentada el 31 de Agosto de 1990

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/610.515, presentada el 8 de Noviembre de 1990

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/810.279, presentada el 17 de Diciembre de 1991

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/853.408, presentada el 18 de Marzo de 1992

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/904.068, presentada el 23 de Junio de 1992

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/919.297, presentada el 24 de Julio de 1992

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/922.649, presentada el 30 de Julio de 1992

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/990.860, presentada el 16 de Diciembre de 1992

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/031.801, presentada el 15 de Marzo de 1993

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/053.131, presentada el 26 de Abril de 1993

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/096.762, presentada el 22 de Julio de 1993

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/112.848, presentada el 27 de Agosto de 1993

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/155.301, presentada el 18 de Noviembre de 1993

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/161.739, presentada el 3 de Diciembre de 1993

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/165.699, presentada el 10 de Diciembre de 1993

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/209.741, presentada el 9 de Marzo de 1994

ES 2 340 745 T3

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/234.145, presentada el 28 de Abril de 1994

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/724.752, presentada el 2 de Octubre de 1996

5 Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/730.639, presentada el 11 de Octubre de 1996

Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996

10 Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 08/759.620, presentada el 3 de Diciembre de 1996

Patente de EE.UU. n° 4.399.216

Patente de EE.UU. n° 4.681.581

15 Patente de EE.UU. n° 4.683.195

Patente de EE.UU. n° 4.683.202

Patente de EE.UU. n° 4.735.210

20 Patente de EE.UU. n° 4.740.461

Patente de EE.UU. n° 4.816.397

25 Patente de EE.UU. n° 4.912.040

Patente de EE.UU. n° 4.959.455

Patente de EE.UU. n° 5.101.827

30 Patente de EE.UU. n° 5.102.990 (RE 35.500)

Patente de EE.UU. n° 5.151.510

35 Patente de EE.UU. n° 5.194.594

Patente de EE.UU. n° 5.434.131

Patente de EE.UU. n° 5.530.101

40 Patente de EE.UU. n° 5.545.806

Patente de EE.UU. n° 5.545.807

45 Patente de EE.UU. n° 5.585.089

Patente de EE.UU. n° 5.591.669

Patente de EE.UU. n° 5.612.205

50 Patente de EE.UU. n° 5.625.126

Patente de EE.UU. n° 5.625.825

55 Patente de EE.UU. n° 5.633.425

Patente de EE.UU. n° 5.643.763

Patente de EE.UU. n° 5.648.471

60 Patente de EE.UU. n° 5.661.016

Patente de EE.UU. n° 5.693.761

65 Patente de EE.UU. n° 5.693.792

Patente de EE.UU. n° 5.697.902

ES 2 340 745 T3

Patente de EE.UU. nº 5.703.057

Patente de EE.UU. nº 5.714.350

5 Patente de EE.UU. nº 5.721.367

Patente de EE.UU. nº 5.733.743

Patente de EE.UU. nº 5.770.197

10 Patente de EE.UU. nº 5.770.429

Patente de EE.UU. nº 5.773.253

15 Patente de EE.UU. nº 5.777.085

Patente de EE.UU. nº 5.789.215

Patente de EE.UU. nº 5.789.650

20 Patente de EE.UU. nº 5.811.097

Patente Europea nº EP 0546073 B1

25 Patente Europea nº EP 0463151 B1, concesión publicada el 12 de Junio de 1996

Solicitud de Patente Internacional nº WO 92/02190

Solicitud de Patente Internacional nº WO 92/03918

30 Solicitud de Patente Internacional nº WO 92/22645

Solicitud de Patente Internacional nº WO 92/22647

35 Solicitud de Patente Internacional nº WO 92/22670

Solicitud de Patente Internacional nº WO 93/00431

Solicitud de Patente Internacional nº WO 93/12227

40 Solicitud de Patente Internacional nº WO 94/00569

Solicitud de Patente Internacional nº WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994

45 Solicitud de Patente Internacional nº WO 94/25585

Solicitud de Patente Internacional nº WO 94/29444

Solicitud de Patente Internacional nº WO 95/01994

50 Solicitud de Patente Internacional nº WO 95/03408

Solicitud de Patente Internacional nº WO 95/24217

55 Solicitud de Patente Internacional nº WO 95/33770

Solicitud de Patente Internacional nº WO 96/14436

Solicitud de Patente Internacional nº WO 96/34096, publicada el 31 de Octubre de 1996

60 Solicitud de Patente Internacional nº WO 97/13852

Solicitud de Patente Internacional nº WO 97/20574

Solicitud de Patente Internacional nº WO 97/38137

65 Solicitud de Patente Internacional nº WO 98/24884

Solicitud de Patente Internacional nº WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano que se une a CTLA-4, o un fragmento ligante de antígenos del mismo, en que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 9 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90% con respecto a la misma, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 22 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90% con respecto a la misma, anticuerpo o fragmento que tiene las propiedades siguientes:

- (a) una afinidad ligante por CTLA-4 de 10^{-9} M o mayor;
- (b) inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-1 con una IC_{50} de 100 nM o menor;
- (c) inhibe la unión entre CTLA-4 y B7-2 con una IC_{50} de 100 nM o menor; y
- (d) potencia la producción de citocinas en un ensayo de células T humanas en 500 pg/ml o mayor.

2. El anticuerpo o el fragmento ligante de antígenos del mismo de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 11.2.1, como se muestra en la Figura 2.

3. El anticuerpo o fragmento ligante de antígenos de acuerdo con la Reivindicación 1 ó 2, en que la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 11.2.1, como se muestra en la Figura 5.

4. El anticuerpo o el fragmento ligante de antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las Reivindicación 1 a 3, en que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 11.2.1, como se muestra en la Figura 2.

5. El anticuerpo o fragmento ligante de antígenos de acuerdo con cualquiera de las Reivindicación 1 a 4, en que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 22.

6. Un anticuerpo monoclonal humano que se une a CTLA-4, en que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 11.2.1, como se muestra en la Figura 2, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 11.2.1, como se muestra en la Figura 5.

7. Un anticuerpo monoclonal humano que se une a CTLA-4, en que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 70 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 71.

8. Un anticuerpo monoclonal humano que se une a CTLA-4, o un fragmento ligante de antígenos del mismo, en que la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 5 y la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 18.

9. Un anticuerpo monoclonal humano que se une a CTLA-4, o un fragmento ligante de antígenos del mismo, en que la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 10 y la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 23.

10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento ligante de antígenos de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Una línea celular que produce el anticuerpo o el fragmento ligante de antígenos de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9.

12. La línea celular de la Reivindicación 11, que es una línea celular de mamífero.

13. La línea celular de la Reivindicación 12, que es una línea celular CHO o una línea celular NSO.

14. Un ácido nucleico que codifica la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo o fragmento ligante de antígenos que se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9.

15. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento ligante de antígenos de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para tratar el cáncer.

16. Un método para la producción del anticuerpo humano anti-CTLA-4 o el fragmento ligante de antígenos de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, que comprende hacer que se exprese dicho anticuerpo o dicho fragmento ligante de antígenos en una línea celular huésped y recuperar dicho anticuerpo o dicho fragmento ligante de antígenos.

ES 2 340 745 T3

17. El método de acuerdo con la Reivindicación 16, en que dicha línea celular huésped es una línea celular de mamífero.

5 18. El método de acuerdo con la Reivindicación 17, en que dicha línea celular de mamífero es una línea celular CHO o una línea celular NSO.

19. El anticuerpo o fragmento ligante de antígenos de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, para uso en el tratamiento del cáncer.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

*Figura 1A*DNA de cadena pesada de 4.1.1

ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GGTTTTCTCTC	GTTGCTCTTT	TAAGAGGTGT	50
CCAGTGTCAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCGTG	GTCCAGCCTG	100
GGAGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTGTAGCGT	CTGGATTCAC	CTTCAGTAGC	150
CATGGCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGCAAGGGGC	TGGAGTGGGT	200
GGCAGTTATA	TGGTATGATG	GAAGAAATAA	ATACTATGCA	GACTCCGTGA	250
AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAGAACAC	GCTGTTTCTG	300
CAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCTGTGTATT	ACTGTGCGAG	350
AGGAGGTCAC	TTCGGTCCTT	TTGACTACTG	GGGCCAGGGA	ACCCTGGTCA	400
CCGTCTCCTC	AGCCTCCACC	AAGGGCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCGCCC	450
TGCTCCAGGA	GCACCTCCGA	GAGCACAGCG	GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA	500
GGACTACTTC	CCCGAACCGG	TGACGGTGTC	GTGGAACCTCA	GGCGCTCTGA	550
CCAGCGGCGT	GCACACCTTC	CCAGCTGTCC	TACAGTCCTC	AGGACTCTAC	600
TCCCTCAGCA	GCGTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAACTTCG	GCACCCAGAC	650
CTACACCTGC	AACGTAGATC	ACAAGCCCAG	CAACACCAAG	GTGGACAAGA	700
CAGTTGAGCG	CAAATGTTGT	GTCGAGTGCC	CACCGTGCCC	AGCACCACCT	750
GTGGCAGGAC	CGTCAGTCTT	CCTCTTCCCC	CCAAAACCCA	AGGACACCCT	800
CATGATCTCC	CGGACCCCTG	AGGTCACGTG	CGTGGTGGTG	GACGTGAGCC	850
ACGAAGACCC	CGAGGTCCAG	TTCAACTGGT	ACGTGGACGG	CGTGGAGGTG	900
CATAATGCCA	AGACAAAGCC	ACGGGAGGAG	CAGTTCAACA	GCACGTTCCG	950
TGTGGTCAGC	GTCCTCACCG	TTGTGCACCA	GGACTGGCTG	AACGGCAAGG	1000
AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGGCC	TCCCAGCCCC	CATCGAGAAA	1050
ACCATCTCCA	AAACCAAAGG	GCAGCCCCGA	GAACCACAGG	TGTACACCCT	1100
GCCCCCATCC	CGGGAGGAGA	TGACCAAGAA	CCAGGTCAGC	CTGACCTGCC	1150
TGGTCAAAGG	CTTCTACCCC	AGCGACATCG	CCGTGGAGTG	GGAGAGCAAT	1200
GGGCAGCCGG	AGAACAATA	CAAGACCACA	CCTCCCATGC	TGGACTCCGA	1250
CGGCTCCTTC	TTCCTCTACA	GCAAGCTCAC	CGTGGACAAG	AGCAGGTGGC	1300
AGCAGGGGAA	CGTCTTCTCA	TGCTCCGTGA	TGCATGAGGC	TCTGCACAAC	1350
CACTACACGC	AGAAGAGCCT	CTCCCTGTCT	CCGGGTAAAT	GA	1392

(ID. SEC. n° 27)

Proteína de cadena pesada de 4.1.1

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSRLRLS	CVASGFTFSS	50
HGMHWVRQAP	GKGLEWVAVI	WYDGRNKYYA	DSVKGRFTIS	RDNSKNTLFL	100
QMNSLRAEDT	AVYYCARGGH	FGPFDYWGQG	TLVTVSSAST	KGPSVFPLAP	150
CSRSTSESTA	ALGCLVKDYF	PEPVTVSWNS	GALTSGVHTF	PAVLQSSGLY	200
SLSSVVTVPS	SNFGTQTYTC	NVDHKPSNTK	VDKIVERKCC	VECPPCPAPP	250
VAGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVQ	FNWYVDGVEV	300
HNAKTKFREE	QFNSTFRVVS	VLTVVHQDWL	NGKEYKCKVS	NKGLPAPIEK	350
TISKTKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN	400
GQPENNYKTT	PPMLDSGGSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	450
HYTQKSLSL	PGK				463

(ID. SEC. n° 1)

Figura 1A (continuación)DNA de cadena kappa de 4.1.1

ATGGAAACCC	CAGCGCAGCT	TCTCTTCCTC	CTGCTACTCT	GGCTCCCAGA	50
TACCACCGGA	GAAATTGTGT	TGACGCAGTC	TCCAGGCACC	CTGTCTTTGT	100
CTCCAGGGGA	AAGAGCCACC	CTCTCCTGCA	GGGCCAGTCA	GAGTATTAGC	150
AGCAGCTTCT	TAGCCTGGTA	CCAGCAGAGA	CCTGGCCAGG	CTCCCAGGCT	200
CCTCATCTAT	GGTGCATCCA	GCAGGGCCAC	TGGCATCCCA	GACAGGTTCA	250
GTGGCAGTGG	GTCTGGGACA	GACTTCACTC	TCACCATCAG	CAGACTGGAG	300
CCTGAAGATT	TTGCAGTGTA	TTACTGTGTA	CAGTATGGTA	CCTCACCCCTG	350
GACGTTCCGC	CAAGGGACCA	AGGTGGAAAT	CAAACGAACT	GTGGCTGCAC	400
CATCTGTCTT	CATCTTCCCG	CCATCTGATG	AGCAGTTGAA	ATCTGGAACT	450
GCCTCTGTTG	TGTGCCTGCT	GAATAACTTC	TATCCCAGAG	AGGCCAAAGT	500
ACAGTGGAAG	GTGGATAACG	CCCTCCAATC	GGGTAACTCC	CAGGAGAGTG	550
TCACAGAGCA	GGACAGCAAG	GACAGCACCT	ACAGCCTCAG	CAGCACCCCTG	600
ACGCTGAGCA	AAGCAGACTA	CGAGAAACAC	AAAGTCTACG	CCTGCGAAGT	650
CACCCATCAG	GGCCTGAGCT	CGCCCCGTCAC	AAAGAGCTTC	AACAGGGGAG	700
AGTGTTAG					708

(ID. SEC. n° 40)

Proteína de cadena kappa de 4.1.1

METPAQLLFL	LLLWLPDTTG	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSIG	50
SSFLAWYQQR	PGQAPRLLIY	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	100
PEDFAVYYCQ	QYGTSPWTFG	QGTKVEIKRT	VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	150
ASVVCLLNNF	YPREAKVQWK	VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYLSSTL	200
TLISKADYEKH	KVYACEVTHQ	GLSSPVTKSF	NRGEC		235

(ID. SEC. n° 14)

*Figura 1B*DNA de cadena pesada de 4.8.1

ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GGTTTTCCTC	GTTGCTCTTT	TAAGAGGTGT	50
CCAGTGTCAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCGTG	GTCCAGCCTG	100
GGAGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTACAGCGT	CTGGATTAC	CTTCAGTAAC	150
TATGGCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGCAAGGGGC	TGGAGTGGGT	200
GGCAGTTATA	TGGTATGATG	GAAGTAATAA	ACACTATGGA	GACTCCGTGA	250
AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGTGACAATT	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG	300
CAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCTGTGTATT	ACTGTGCGAG	350
AGGAGAGAGA	CTGGGGTCCT	ACTTTGACTA	CTGGGGCCAG	GGAACCCTGG	400
TCACCGTCTC	CTCAGCCTCC	ACCAAGGGCC	CATCGGTCTT	CCCCCTGGCG	450
CCCTGCTCCA	GGAGCACCTC	CGAGAGCACA	GCGGCCCTGG	GCTGCCTGGT	500
CAAGGACTAC	TTCCCCGAAC	CGGTGACGGT	GTCGTGGAAC	TCAGGCGCTC	550
TGACCAGCGG	CGTGACACAC	TTCCCAGCTG	TCCTACAGTC	CTCAGGACTC	600
TACTCCCTCA	GCAGCGTGGT	GACCGTGCCC	TCCAGCAACT	TCGGCACCCA	650
GACCTACACC	TGCAACGTAG	ATCACAAGCC	CAGCAACACC	AAGGTGGACA	700
AGACAGTTGA	GCGCAAATGT	TGTGTCGAGT	GCCCACCGTG	CCCAGCACCA	750
CCTGTGGCAG	GACCGTCAGT	CTTCCTCTTC	CCCCCAAAC	CCAAGGACAC	800
CCTCATGATC	TCCCGGACCC	CTGAGGTCAC	GTGCGTGGTG	GTGGACGTGA	850
GCCACGAAGA	CCCCGAGGTC	CAGTTCAACT	GGTACGTGGA	CGGCGTGGAG	900
GTGCATAATG	CCAAGACAAA	GCCACGGGAG	GAGCAGTTCA	ACAGCACGTT	950
CCGTGTGGTC	AGCGTCCTCA	CCGTTGTGCA	CCAGGACTGG	CTGAACGGCA	1000
AGGAGTACAA	GTGCAAGGTC	TCCAACAAAG	GCCTCCCAGC	CCCCATCGAG	1050
AAAACCATCT	CCAAAACCAA	AGGGCAGCCC	CGAGAACCAC	AGGTGTACAC	1100
CCTGCCCCCA	TCCCGGGAGG	AGATGACCAA	GAACCAGGTC	AGCCTGACCT	1150
GCCTGGTCAA	AGGCTTCTAC	CCCAGCGACA	TCGCCGTGGA	GTGGGAGAGC	1200
AATGGGCAGC	CGGAGAACAA	CTACAAGACC	ACACCTCCCA	TGCTGGACTC	1250
CGACGGCTCC	TTCTTCCTCT	ACAGCAAGCT	CACCGTGGAC	AAGAGCAGGT	1300
GGCAGCAGGG	GAACGTCTTC	TCATGCTCCG	TGATGCATGA	GGCTCTGCAC	1350
AACCACTACA	CGCAGAAGAG	CCTCTCCCTG	TCTCCGGGTA	AATGA	1395

(ID. SEC. n° 28)

Proteína de cadena pesada de 4.8.1

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CTASGFTFSN	50
YGMHWVRQAP	GKGLEWVAVI	WYDGSNKHVG	DSVKGRFTIS	SDNSKNTLYL	100
QMNSLRAEDT	AVYYCARGER	LGSYFDYWQ	GTLTVSSAS	TKGPSVFPLA	150
PCSRSTSEST	AALGCLVKDY	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL	200
YSLSSVVTVP	SSNFGTQTYT	CNVDHKPSNT	KVDKTVKRC	CVECPPCPAP	250
PVAGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	QFNWYVDGVE	300
VHNAKTKPRE	EQFNSTFRVV	SVLTIVVHQDW	LNGKEYKCKV	SNKGLPAPIE	350
KTISKTKGQP	REPOVYTLPP	SREEMTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	400
NGQPENNYKT	TPPMLDSDGS	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	500
NHYTQKSLSL	SPGK				514

(ID. SEC. n° 2)

Figura 1B (continuación)DNA de cadena kappa de 4.8.1

ATGGAAACCC	CAGCGCAGCT	TCTCTTCCTC	CTGCTACTCT	GGCTCCCAGA	50
TACCACCGGA	GAAATTGTGT	TGACGCAGTC	TCCAGGCACC	CTGTCTTTGT	100
CTCCAGGGGA	AAGAGCCACC	CTCTCCTGCA	GGACCAGTGT	TAGCAGCAGT	150
TACTTAGCCT	GGTACCAGCA	GAAACCTGGC	CAGGCTCCCA	GGCTCCTCAT	200
CTATGGTGCA	TCCAGCAGGG	CCACTGGCAT	CCCAGACAGG	TTCAGTGGCA	250
GTGGGTCTGG	GACAGACTTC	ACTCTCACCA	TCAGCAGACT	GGAGCCTGAA	300
GATTTTGCAG	TCTATTACTG	TCAGCAGTAT	GGCATCTCAC	CCTTCACTTT	350
CGGCGGAGGG	ACCAAGGTGG	AGATCAAGCG	AACTGTGGCT	GCACCATCTG	400
TCTTCATCTT	CCCGCCATCT	GATGAGCAGT	TGAAATCTGG	AACTGCCTCT	450
GTTGTGTGCC	TGCTGAATAA	CTTCTATCCC	AGAGAGGCCA	AAGTACAGTG	500
GAAGGTGGAT	AACGCCCTCC	AATCGGGTAA	CTCCCAGGAG	AGTGTCACAG	550
AGCAGGACAG	CAAGGACAGC	ACCTACAGCC	TCAGCAGCAC	CCTGACGCTG	600
AGCAAAGCAG	ACTACGAGAA	ACACAAAGTC	TACGCCTGCG	AAGTCACCCA	650
TCAGGGCCTG	AGCTCGCCCC	TCACAAAGAG	CTTCAACAGG	GGAGAGTGTT	700
AG					702

(ID. SEC. n° 41)

Proteína de cadena kappa de 4.8.1

METPAQLLFL	LLLWLPTDTG	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRTSVSSS	50
YLAWYQOKPG	QAPRLLIYGA	SSRATGIPDR	FSGSGSGTDF	TLTISRLEPE	100
DFAVYYCQOY	GISPFTFGGG	TKVEIKRTVA	APSVFIFPPS	DEQLKSGTAS	150
VVCLLNNFYP	REAKVQWKVD	NALQSGNSQE	SVTEQDSKDS	TYSLSSTLTL	200
SKADYEKHKV	YACEVTHQGL	SSPVTKSFNR	GEC		233

(ID. SEC. n° 15)

*Figura 1C*DNA de cadena pesada de 4.14.3

CCTGGGAGGT	CCCTGAGACT	CTCCTGTGCA	GCGTCTGGAT	TCACCTTCAG	50
TAGTCATGGC	ATCCACTGGG	TCCGCCAGGC	TCCAGGCAAG	GGGCTGGAGT	100
GGGTGGCAGT	TATATGGTAT	GATGGAAGAA	ATAAAGACTA	TGCAGACTCC	150
GTGAAGGGCC	GATTCACCAT	CTCCAGAGAC	AATTCCAAGA	AGACGCTGTA	200
TTTGCAAATG	AACAGCCTGA	GAGCCGAGGA	CACGGCTGTG	TATTACTGTG	250
CGAGAGTGGC	CCCCTGCGG	CCACTTGACT	ACTGGGGCCA	GGGAACCCTG	300
GTCACCGTCT	CCTCAGCCTC	CACCAAGGGC	CCATCGGTCT	TCCCCCTGGC	350
GCCCTGCTCC	AGGAGCACCT	CCGAGAGCAC	AGCGGCCCTG	GGCTGCCTGG	400
TCAAGGACTA	CTTCCCCGAA	CCGGTGACGG	TGTCGTGGAA	CTCAGGCGCT	450
CTGACCAGCG	GCGTGCACAC	CTTCCCAGCT	GTCCTACAG		489

(ID. SEC. n° 29)

Proteína de cadena pesada de 4.14.3

PGRSLRLSCA	ASGFTFSSHG	IHWVRQAPGK	GLEWVAVIWY	DGRNKDYADS	50
VKGRFTISR	NSKKTLYLQM	NSLRAEDTAV	YYCARVAPLG	PLDYWGQGT	100
VTVSSASTKG	PSVFPLAPCS	RSTSESTAAL	GCLVKDYFPE	PVTVSWNSGA	150
LTSGVHTFPA	VLQ				163

(ID. SEC. n° 3)

DNA de cadena kappa de 4.14.3

GGCACCTGT	CTTTGTCTCC	AGGGGAAAGA	GCCACCCTCT	CCTGCAGGGC	50
CAGTCAGAGT	GTCAGCAGCT	ACTTAGCCTG	GTACCAGCAG	AAACCTGGCC	100
AGGCTCCAG	ACTCCTCATC	TATGGTGCAT	CCAGCAGGGC	CACTGGCATC	150
CCAGACAGGT	TCAGTGGCAG	TGGGTCTGGG	ACAGACTTCA	CTCTCACCAT	200
CAGCAGACTG	GAGCCTGAGG	ATTTTGCAGT	GTATTACTGT	CAGCAGTATG	250
GTAGGTCACC	ATTCACCTTC	GGCCCTGGGA	CCAAAGTGGA	TATCAAGCGA	300
ACTGTGGCTG	CACCATCTGT	CTTCATCTTC	CCGCCATCTG	ATGAGCAGTT	350
GAAATCTGGA	ACTGCCTCTG	TTGTGTGCCT	GCTGAATAAC	TTCTATCCCA	400
GAGAGGCCAA	AGTACAG				417

(ID. SEC. n° 42)

Proteína de cadena kappa de 4.14.3

GTLSLSPGER	ATLSCRASQS	VSSYLAWYQQ	KPGQAPRLLI	YGASSRATGI	50
PDRFSGSGSG	TDFTLTISRL	EPEDFAVYYC	QQYGRSPFTF	GPGTKVDIKR	100
TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQ		139

(ID. SEC. n° 16)

*Figura 1D*DNA de cadena pesada de 6.1.1

ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GGTTTTCTCTC	GTTGCTCTTT	TAAGAGGTGT	50
CCAGTGTCAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCGTG	GTCGAGCCTG	100
GGAGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTACAGCGT	CTGGATTAC	CTTCAGTAGT	150
TATGGCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGCAAGGGGC	TGGAGTGGGT	200
GGCAGTTATA	TGGTATGATG	GAAGCAATAA	ACACTATGCA	GACTCCGCGA	250
AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG	300
CAAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCTGTGTATT	ACTGTGCGAG	350
AGCCGGACTG	CTGGGTACT	TTGACTACTG	GGGCCAGGGA	ACCCTGGTCA	400
CCGTCTCCTC	AGCCTCCACC	AAGGGCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCGCCC	450
TGCTCCAGGA	GCACCTCCGA	GAGCACAGCG	GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA	500
GGACTACTTC	CCCGAACCGG	TGACGGTGTC	GTGGAACCTCA	GGCGCTCTGA	550
CCAGCGGCGT	GCACACCTTC	CCAGCTGTCC	TACAGTCCTC	AGGACTCTAC	600
TCCCTCAGCA	GCGTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAACTTCG	GCACCCAGAC	650
CTACACCTGC	AACGTAGATC	ACAAGCCCAG	CAACACCAAG	GTGGACAAGA	700
CAGTTGAGCG	CAAATGTTGT	GTCGAGTGCC	CACCGTGCCC	AGCACCACCT	750
GTGGCAGGAC	CGTCAGTCTT	CCTCTTCCCC	CCAAAACCCA	AGGACACCCT	800
CATGATCTCC	CGGACCCCTG	AGGTCACGTG	CGTGGTGGTG	GACGTGAGCC	850
ACGAAGACCC	CGAGGTCCAG	TTCAACTGGT	ACGTGGACGG	CGTGGAGGTG	900
CATAATGCCA	AGACAAAGCC	ACGGGAGGAG	CAGTTCAACA	GCACGTTCCG	950
TGTGGTCAGC	GTCCTCACCG	TTGTGCACCA	GGACTGGCTG	AACGGCAAGG	1000
AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGGCC	TCCCAGCCCC	CATCGAGAAA	1050
ACCATCTCCA	AAACCAAAGG	GCAGCCCCGA	GAACCACAGG	TGTACACCCT	1100
GCCCCCATCC	CGGGAGGAGA	TGACCAAGAA	CCAGGTCAGC	CTGACCTGCC	1150
TGGTCAAAGG	CTTCTACCCC	AGCGACATCG	CCGTGGAGTG	GGAGAGCAAT	1200
GGGCAGCCGG	AGAACAATA	CAAGACCACA	CCTCCCATGC	TGGACTCCGA	1250
CGGCTCCTTC	TTCCTCTACA	GCAAGCTCAC	CGTGGACAAG	AGCAGGTGGC	1300
AGCAGGGGAA	CGTCTTCTCA	TGCTCCGTGA	TGCATGAGGC	TCTGCACAAC	1350
CACTACACGC	AGAAGAGCCT	CTCCCTGTCT	CCGGGTAAAT	GA	1392

(ID. SEC. n° 30)

Proteína de cadena pesada de 6.1.1

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VEPGRSLRLS	CTASGFTFSS	50
YGMHWVRQAP	GKGLEWVAVI	WYDGSNKHYA	DSAGRFTIS	RDNSKNTLYL	100
QMNSLRAEDT	AVYYCARAGL	LGYFDYWQGG	TLVTVSSAST	KGPSVFPLAP	150
CSRSTSESTA	ALGCLVKDYF	PEPVTVSWNS	GALTSGVHTF	PAVLQSSGLY	200
SLSSVVTVP	SNFGTQTYTC	NVDHKPSNTK	VDKTVERKCC	VECPPCPAPP	250
VAGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVQ	FNWYVDGVEV	300
HNAKTKPREE	QFNSTFRVVS	VLTVVHQDWL	NGKEYKCKVS	NKGLPAPIEK	350
TISKTKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN	400
GQFENNYKTT	PPMLDSGGSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	450
HYTQKSLSL	PGK				463

(ID. SEC. n° 4)

Figura 1D (continuación)DNA de cadena kappa de 6.1.1

ATGGAAACCC	CAGCGCAGCT	TCTCTTCCTC	CTGCTACTCT	GGCTCCCAGA	50
TACCACCGGA	GAAATTGTGT	TGACGCAGTC	TCCAGGCACC	CTGTCTTTGT	100
CTCCAGGGGA	AAGAGCCACC	CTCTCCTGTA	GGGCCAGTCA	AAGTGTTAGC	150
AGCTACTTAG	CCTGGTACCA	ACAGAAACCT	GGCCAGGCTC	CCAGGCCCCCT	200
CATCTATGGT	GTATCCAGCA	GGGCCACTGG	CATCCCAGAC	AGGTTCAGTG	250
GCAGTGGGTC	TGGGACAGAC	TTCACTCTCA	CCATCAGCAG	ACTGGAGCCT	300
GAAGATTTTG	CAGTGTATTA	CTGTCAGCAG	TATGGTATCT	CACCATTAC	350
TTTCGGCCCT	GGGACCAAAG	TGGATATCAA	ACGAACTGTG	GCTGCACCAT	400
CTGTCTTCAT	CTTCCCGCCA	TCTGATGAGC	AGTTGAAATC	TGGAAGTGCC	450
TCTGTTGTGT	GCCTGCTGAA	TAACTTCTAT	CCCAGAGAGG	CCAAAGTACA	500
GTGGAAGGTG	GATAACGCCC	TCCAATCGGG	TAACTCCCAG	GAGAGTGTCA	550
CAGAGCAGGA	CAGCAAGGAC	AGCACCTACA	GCCTCAGCAG	CACCCTGACG	600
CTGAGCAAAG	CAGACTACGA	GAAACACAAA	GTCTACGCCT	GCGAAGTCAC	650
CCATCAGGGC	CTGAGCTCGC	CCGTCACAAA	GAGCTTCAAC	AGGGGAGAGT	700
GTTAG					705

(ID. SEC. nº 43)

Proteína de cadena kappa de 6.1.1

METPAQLLFL	LLLWLPDTTG	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	50
SYLAWYQQKP	GQAPRPLIYG	VSSRATGIPD	RFSGSGSGTD	FTLTISRLEP	100
EDFAVYYCQQ	YGISPFTFGP	GTKVDIKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	150
SVVCLLNIFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSTLT	200
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		234

(ID. SEC. nº 17)

*Figura 1E*DNA de cadena pesada de 3.1.1

GGCGTGGTCC	AGCCTGGGAG	GTCCCTGAGA	CTCTCCTGTG	CAGCGTCTGG	50
ATTCACCTTC	AGTAGCTATG	GCATGCACTG	GGTCCGCCAG	GCTCCAGGCA	100
AGGGGCTGGA	GTGGGTGGCA	GTTATATGGT	ATGATGGAAG	TAATAAATAC	150
TATGCAGACT	CCGTGAAGGG	CCGATTCACC	ATCTCCAGAG	ACAATTCCAA	200
GAACACGCTG	TATCTGCAAA	TGAACAGCCT	GAGAGCCGAG	GACACGGCTG	250
TGTATTACTG	TGCGAGAGGG	GCCCGTATAA	TAACCCCTTG	TATGGACGTC	300
TGGGGCCAAG	GGACCACGGT	CACCGTCTCC	TCAGCCTCCA	CCAAGGGCCC	350
ATCGGTCTTC	CCCCTGGCGC	CCTGCTCCAG	GAGCACCTCC	GAGAGCACAG	400
CGGCCCTGGG	CTGCCTGGTC	AAGGACTACT	TCCCCGAACC	GGTGACGGTG	450
TCGTGGAAC	CAGGCGCTCT	GACCAGCGGC	GTGCACACCT	TCCCAGCTGT	500
CCTACAG					507

(ID. SEC. n° 31)

Proteína de cadena pesada de 3.1.1

GVVQPGRSLR	LSCAASGFTF	SSYGMHWVRQ	APGKGLEWVA	VIWYDGSNKY	50
YADSVKGRFT	ISRDNKNTL	YLOMNSLRAE	DTAVYYCARG	ARIITPCMDV	100
WGQGTITVTVS	SASTKGPSVF	PLAPCSRSTS	ESTAALGCLV	KDYFPEPVTV	150
SWNSGALTSG	VHTFPAVLQ				169

(ID. SEC. n° 5)

DNA de cadena kappa de 3.1.1

CAGTCTCCAT	CCTCCCTGTC	TGCATCTGTA	GGAGACAGAG	TCACCATCAC	50
TTGCCGGGCA	AGTCAGAGCA	TTAACACCTA	TTTAATTTGG	TATCAGCAGA	100
AACCAGGGAA	AGCCCCTAAC	TTCCTGATCT	CTGCTACATC	CATTTTGCAA	150
AGTGGGGTCC	CATCAAGGTT	CCGTGGCAGT	GGCTCTGGGA	CAAATTTTAC	200
TCTCACCATC	AACAGTCTTC	ATCCTGAAGA	TTTTGCAACT	TACTACTGTC	250
AACAGAGTTA	CAGTACCCCA	TTCACTTTCG	GCCCTGGGAC	CAAAGTGGAT	300
ATCAAACGAA	CTGTGGCTGC	ACCATCTGTC	TTCATCTTCC	CGCCATCTGA	350
TGAGCAGTTG	AAATCTGGAA	CTGCCTCTGT	TGTGTGCCTG	CTGAATAACT	400
TCTATCCCAG	AGAGGCCAAA	GTACAGTGGA	AGGTGGATAA	CGCCCTCCAA	450
TCGGGTAA					458

(ID. SEC. n° 44)

Proteína de cadena kappa de 3.1.1

QSPSSLASV	GDRVITICRA	SQSINTYLIW	YQKPGKAPN	FLISATSILO	50
SGVPSRFRGS	GSNTNFTLTI	NSLHPEDFAT	YICQQSYSTP	FTFGPGTKVD	100
IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK	VQWKVDNALQ	150
SG					152

(ID. SEC. n° 18)

*Figura 1F*DNA de cadena pesada de 4.10.2

GGCGTGGTCC	AGCCTGGGAG	GTCCCTGAGA	CTCTCCTGTG	TAGCGTCTGG	50
ATTCATCTTC	AGTAGTCATG	GCATCCACTG	GGTCCGCCAG	GCTCCAGGCA	100
AGGGGCTGGA	GTGGGTGGCA	GTTATATGGT	ATGATGGAAG	AAATAAAGAC	150
TATGCAGACT	CCGTGAAGGG	CCGATTCACC	ATCTCCAGAG	ACAATTCCAA	200
GAACACGCTG	TATTTGCAAA	TGAACAGCCT	GAGAGCCGAG	GACACGGCTG	250
TGTATTACTG	TGCGAGAGTG	GCCCCACTGG	GGCCACTTGA	CTACTGGGGC	300
CAGGGAACCC	TGGTCACCGT	CTCCTCAGCC	TCCACCAAGG	GCCCATCGGT	350
CTTCCCCCTG	GCGCCCTGCT	CCAGGAGCAC	CTCCGAGAGC	ACAGCGGCCC	400
TGGGCTGCCT	GGTCAAGGAC	TACTTCCCCG	AACCGGTGAC	GGTGTCTGTTG	450
AACTCAGGCG	CTCTGACCAG	CGGCGTGCAC	ACCTTCCCAG	CTGTCCTACA	500
G					501

(ID. SEC. n° 32)

Proteína de cadena pesada de 4.10.2

GVVQPGRSLR	LSCVASGFIF	SSHGIHWVRQ	APGKGLEWVA	VIWYDGRNKD	50
YADSVKGRFT	ISRDNSKNTL	YLQMNSLRAE	DTAVYYCARV	APLGPLDYWG	100
QGTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APCSRSTSES	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	150
NSGALTSGVH	TFPAVLQ				167

(ID. SEC. n° 6)

DNA de cadena kappa de 4.10.2

TCTCCAGGCA	CCCTGTCTTT	GTCTCCAGGG	GAAAGAGCCA	CCCTCTCCTG	50
CAGGGCCAGT	CAGAGTATTA	GCAGCAATTT	CTTAGCCTGG	TACCAGCAGA	100
AACCTGGCCA	GGCTCCCAGG	CTCCTCATCT	ATCGTCCATC	CAGCAGGGCC	150
ACTGGCATCC	CAGACAGTTT	CAGTGGCAGT	GGGTCTGGGA	CAGACTTCAC	200
TCTCACCATC	AGCAGACTGG	AGCCTGAGGA	TTTTGCATTA	TATTACTGTC	250
AGCAGTATGG	TACGTCACCA	TTCACTTTCG	GCCCTGGGAC	CAAAGTGGAT	300
ATCAAGCGAA	CTGTGGCTGC	ACCATCTGTC	TTCATCTTCC	CGCCATCTGA	350
TGAGCAGTTG	AAATCTGGAA	CTGCCTCTGT	TGTGTGCCTG	CTGAATAACT	400
TCTATCCCAG	AGAGGCCAAA	GTACAG			426

(ID. SEC. n° 45)

Proteína de cadena kappa de 4.10.2

SPGTLSSLSPG	ERATLSCRAS	QSISSNFLAW	YQKPGQAPR	LLIYRPSSRA	50
TGIPDSFSGS	GSGETDFTLTI	SRLEPEDFAL	YQCQYGTSP	FTFGPGTKVD	100
IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL	KSGTASVVCL	LNNFYPRK	VQ	142

(ID. SEC. n° 19)

*Figura 1G*DNA de cadena pesada de 2.1.3

TCGGGCCCAG	GACTGGTGAA	GCCTTCACAG	ATCCTGTCCC	TCACCTGCAC	50
TGTCTCTGGT	GGCTCCATCA	GCAGTGGTGG	TCACTACTGG	AGCTGGATCC	100
GCCAGCACCC	AGGGAAGGGC	CTGGAGTGGA	TTGGGTACAT	CTATTACATT	150
GGGAACACCT	ACTACAACCC	GTCCCTCAAG	AGTCGAGTTA	CCATATCAGT	200
AGACACGTCT	AAGAACCAGT	TCTCCCTGAA	GCTGAGCTCT	GTGACTGCCG	250
CGGACACGGC	CGTGTATTAT	TGTGCGAGAG	ATAGTGGGGA	CTACTACGGT	300
ATAGACGTCT	GGGGCCAAGG	GACCACGGTC	ACCGTCTCCT	CAGCTTCCAC	350
CAAGGGCCCCA	TCCGTCTTCC	CCCTGGCGCC	CTGCTCCAGG	AGCACCTCCG	400
AGAGCACAGC	CGCCCTGGGC	TGCCTGGTCA	AGGACTACTT	CCCCGAACCG	450
GTGACGGTGT	CGTGGAAGTC	AGGCGCCCTG	ACCAGCGGCG	TGCACACCTT	500
CCCGGCTGTC	CTACAA				516

(ID. SEC. n° 33)

Proteína de cadena pesada de 2.1.3

SGPGLVKPSQ	ILSLTCTVSG	GSISSGGHYW	SWIRQHPGKG	LEWIGYIYYI	50
GNTYYNPSLK	SRVTISVDTS	KNQFSLKLSS	VTAADTAVYY	CARDSGDYYG	100
IDVWGQGTTV	TVSSASTKGP	SVFPLAPCSR	STSESTAALG	CLVKDYFPEP	150
VTVSWNSGAL	TSGVHTFPAV	LQ			172

(ID. SEC. n° 7)

DNA de cadena kappa de 2.1.3

TCTCCAGACT	TTCAGTCTGT	GACTCCAAAG	GAGAAAGTCA	CCATCACCTG	50
CCGGGCCAGT	CAGAGCATTG	GTAGTAGCTT	ACATTGGTAT	CAGCAGAAAC	100
CAGATCAGTC	TCCAAAGCTC	CTCATCAAGT	ATGCTTCCCA	GTCCTTCTCT	150
GGGGTCCCCT	CGAGGTTTCAG	TGGCAGTGGA	TCTGGGACAG	ATTTACCCCT	200
CACCATCAAT	AGCCTGGAAG	CTGAAGATGC	TGCAACGTAT	TACTGTCATC	250
AGAGTAGTAG	TTTACCGCTC	ACTTTCGGCG	GAGGGACCAA	GGTGGAGATC	300
AAACGAACTG	TGGCTGCACC	ATCTGTCTTC	ATCTTCCCGC	CATCTGATGA	350
GCAGTTGAAA	TCTGGAAGTG	CCTCTGTTGT	GTGCCTGCTG	AATAACTTCT	400
ATCCAGAGA	GGCCAAAGTA	CAGTGGAAGG	TGATAACGC	CCTCCAATCG	450
GGTAACTCCC	AGGAG				465

(ID. SEC. n° 46)

Proteína de cadena kappa de 2.1.3

SPDFQSVTPK	EKVTITCRAS	QSIGSSLHWY	QQKPDQSPKL	LIKYASQSFS	50
GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIN	SLEAEDAATY	YCHQSSSLPL	TFGGGTKVEI	100
KRTVAAPSVF	IFPPSDEQLK	SGTASVVCLL	NNFYPREAKV	QWKVDNALQS	150
GNSQE					155

(ID. SEC. n° 20)

*Figura 1H*DNA de cadena pesada de 4.13.1

CCTGGGAGGT	CCCTGAGACT	CTCCTGTGCA	GCGTCTGGAT	TCACCTTCAG	50
TAGTCATGGC	ATCCACTGGG	TCCGCCAGGC	TCCAGGCAAG	GGGCTGGAGT	100
GGGTGGCAGT	TATATGGTAT	GATGGAAGAA	ATAAAGACTA	TGCAGACTCC	150
GTGAAGGGCC	GATTCACCAT	CTCCAGAGAC	AATTCCAAGA	ACACGCTGTA	200
TTTGCAAATG	AACAGCCTGA	GAGCCGAGGA	CACGGCTGTG	TATTACTGTG	250
CGAGAGTGGC	CCCACTGGGG	CCACTTGACT	ACTGGGGCCA	GGGAACCCTG	300
GTCACCGTCT	CCTCAGCCTC	CACCAAGGGC	CCATCGGTCT	TCCCCCTGGC	350
GCCCTGCTCC	AGGAGCACCT	CCGAGAGCAC	AGCGGCCCTG	GGCTGCCTGG	400
TCAAGGACTA	CTTCCCCGAA	CCGGTGACGG	TGTCGTGGAA	CTCAGGCGCT	450
CTGACCAGC					459

(ID. SEC. n° 34)

Proteína de cadena pesada de 4.13.1

PGRSLRLSCA	ASGFTFSSHG	IHWVRQAPGK	GLEWVAWIWY	DGRNKDYADS	50
VKGRFTISR	NSKNTLYLQM	NSLRAEDTAV	YYCARVAPLG	PLDYWGQGT	100
VTVSSASTKG	PSVFPLAPCS	RSTSESTAAL	GCLVKDYFPE	PVTVSWNSGA	150
LTS					153

(ID. SEC. n° 8)

DNA de cadena kappa de 4.13.1

CAGTCTCCAG	GCACCCTGTC	TTTGTCTCCA	GGGGAAAGAG	CCACCCTCTC	50
CTGCAGGGCC	AGTCAGAGTG	TCAGCAGCTA	CTTAGCCTGG	TACCAGCAGA	100
AACCTGGCCA	GGCTCCCAGG	CTCCTCATCT	ATGGTGCATC	CAGCAGGGCC	150
ACTGGCATCC	CAGACAGGTT	CAGTGGCAGT	GGGTCTGGGA	CAGACTTCAC	200
TCTCACCATC	AGCAGACTGG	AGCCTGAGGA	TTTTGCAGTG	TATTACTGTC	250
AACAGTATGG	TAGGTCACCA	TTCACTTTCG	GCCCTGGGAC	CAAAGTAGAT	300
ATCAAGCGAA	CTGTGGCTGC	ACCATCTGTC	TTCATCTTCC	CGCCATCTGA	350
TGAGCAGTTG	AAATCTGGAA	CTGCCTCTGT	TGTGTGCCTG	CTGAATAACT	400
TCTATCCCAG	AGAGGCCAAA	GTACAGTGGA	AAGGTGGATA		440

(ID. SEC. n° 47)

Proteína de cadena kappa de 4.13.1

QSPGTL	SLSP	GERATL	SCRA	SQSVSSYLAW	YQKPGQAPR	LLIYGASSRA	50	
TGIPDR	FSGS	SGTDF	TLTI	SRLEPEDFAV	YQCQYGRSP	FTFGPGTKVD	100	
IKRTVA	APSV	FIFPPS	DEQL	KSGTASVVCL	LNNFY	PREAK	VQWKGG	146

(ID. SEC. n° 21)

FIGURA 11DNA de cadena pesada de 11.2.1

```

GGCGTGGTCC AGCCTGGGAG GTCCCTGAGA CTCTCCTGTG CAGCGTCTGG 50
ATTCACCTTC AGTAGCTATG GCATGCACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGCA 100
AGGGGCTGGA GTGGGTGGCA GTTATATGGT ATGATGGAAG TAATAAATAC 150
TATGCAGACT CCGTGAAGGG CCGATTACC ATCTCCAGAG ACAATTCCAA 200
GAACACGCTG TATCTGCAA TGAACAGCCT GAGAGCCGAG GACACGGCTG 250
TGTATTACTG TGCAGAGAT CCGAGGGGAG CTACCCTTTA CTACTACTAC 300
TACCGGTKGG ACGTCTGGGG CCAAGGGACC ACGGTCACCG TCTCCTCAGC 350
CTCCACCAAG GGCCCATCGG TCTTCCCCCT GGCGCCCTGC TCCAGGAGCA 400
CCTCCGAGAG CACAGCGGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCC 450
GAACCGGTGA CGGTGTCGTG GAACTCAGGC GCTCTGACCA GCGGCGTGCA 500
CAC 503

```

(ID. SEC. nº 9)

Proteína de cadena pesada de 11.2.1

```

GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APKGLEWVA VIWYDGSNKY 50
YADSVKGRFT ISRDNKNTL YLQMNSLR AE DTAVYYCARD PRGATLYYYY 100
YRXDVWGQGT TVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP 150
EPVTVSWNSG ALTSGVH

```

(ID. SEC. nº 9)

DNA de cadena kappa de 11.2.1

```

CCATCCTCCC TGTCTGCATC TGTAGGAGAC AGAGTCACCA TCACTTGCCG 50
GGCAAGTCAG AGCATTAACA GCTATTTAGA TTGGTATCAG CAGAAACCAG 100
GGAAAGCCCC TAAACTCCTG ATCTATGCTG CATCCAGTTT GCAAAGTGGG 150
GTCCCATCAA GGTTCAGTGG CAGTGGATCT GGGACAGATT TCACTCTCAC 200
CATCAGCAGT CTGCAACCTG AAGATTTTGC AACTTACTAC TGTCAACAGT 250
ATTACAGTAC TCCATTCACT TTCGGCCCTG GGACCAAAGT GGAAATCAAA 300
CGAACTGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA 350
GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC 400
CCAGAGAGGC CAAAGTA 417

```

(ID. SEC. nº 48)

Proteína de cadena kappa de 11.2.1

```

PSSLASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG 50
VPSRFSGSGS GTDFTLTSS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK 100
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKV 139

```

(ID. SEC. nº 22)

FIGURA 1JDNA de cadena pesada de 11.6.1

GGCGTGGTCC	AGCCTGGGAG	GTCCCTGAGA	CTCTCCTGTG	CAGCGTCTGG	50
ATTCACCTTC	AGTAGCTATG	GCATGCACTG	GGTCCGCCAG	GCTCCAGGCA	100
AGGGGCTGGA	GTGGGTGGCA	GTTATATGGT	ATGATGGAAG	TCATAAATAC	150
TATGCAGACT	CCGTGAAGGG	CCGATTCACC	ATCTCCAGAG	ACAATTCCAA	200
GAACACGCTG	TATCTGCAAA	TGAACAGCCT	GAGAGCCGAG	GACACGGCTG	250
TGTATTACTG	TGCGAGAGGC	GCTGTAGTAG	TACCAGCTGC	TATGGACGTC	300
TGGGGCCAAG	GGACCACGGT	CACCGTCTCC	TCAGCCTCCA	CCAAGGGCCC	350
ATCGGTCTTC	CCCCTGGCGC	CCTGCTCCAG	GAGCACCTCC	GAGAGCACAG	400
CGGCCCTGGG	CTGCCTGGTC	AAGGACTACT	TCCCCGAACC	GGTGACGGTG	450
T					451

(ID. SEC. nº 36)

Proteína de cadena pesada de 11.6.1

GVVQPGRSLR	LSCAASGFTF	SSYGMHWVRQ	APGKGLEWVA	VIWYDGSHKY	50
YADSVKGRFT	ISRDNSKNTL	YLQMNSLRAE	DTAVYYCARG	AVVVPAAMDV	100
WGQGTITVTVS	SASTKGPSVF	PLAPCSRSTS	ESTAALGCLV	KDYFPEPVTV	150
S					151

(ID. SEC. nº 10)

DNA de cadena kappa de 11.6.1

ACCCAGTCTC	CATCCTCCCT	GTCTGCATCT	GTAGGAGACA	GAGTCACCAT	50
CACTTGCCGG	GCAAGTCAGA	ACATTAGCAG	GTATTTAAAT	TGGTATCAAC	100
AGAAACCAGG	GAAAGCCCCT	AAGTTCCTGA	TCTATGTTGC	ATCTATTTTG	150
CAAAGTGGGG	TCCCATCAGG	GTTCAGTGCC	AGTGGATCTG	GGCCAGATTT	200
CACTCTNACC	ATCAGCAGTC	TGCAACCTGA	AGATTTTGCA	ACTTACTACT	250
GTCAACAGAG	TTACAGTACC	CCATTCACTT	TCGGCCCTGG	GACCAAAGTG	300
GATATCAAAC	GAAGTGTGGC	TGCACCATCT	GTCTTCATCT	TCCCGCCATC	350
TGATGAGCAG	TTGAAATCTG	GAAGTGCCTC	TGTTGTGTGC	CTGCTGAATA	400
AC					402

(ID. SEC. nº 49)

Proteína de cadena kappa de 11.6.1

TQSPSSLSAS	VGDRVITICR	ASQNISRYLN	WYQOKPGKAP	KFLIYVASIL	50
QSGVPSPGSA	SGSGPDFTLT	ISSLPEDFA	TYCQQSYST	PFTFGPGTKV	100
DIKRTVAAPS	VFIFPPSDEQ	LKSGTASVVC	LLNN		134

(ID. SEC. nº 23)

*Figura 1K*DNA de cadena pesada de 11.7.1

GTGGTCCAGC	CTGGGAGGTC	CCTGAGACTC	TCCTGTGCAG	CGTCTGGATT	50
CACCTTCAGT	AGCNGTGGCA	TGCACTGGGT	CCGCCAGGCT	CCAGGCAAGG	100
GGCTGGAGTG	GGTGGCAGTT	ATATGGTCTG	ATGGAAGTCA	TAAATACTAT	150
GCAGACTCCG	TGAAGGGCCG	ATTCACCATC	TCCAGAGACA	ATTCCAAGAA	200
CACGCTGTAT	CTGCAAATGA	ACAGCCTGAG	AGCCGAGGAC	ACGGCTGTGT	250
ATTACTGTGC	GAGAGGAACT	ATGATAGTAG	TGGGTACCCT	TGACTACTGG	300
GGCCAGGGAA	CCCTGGTCAC	CGTCTCCTCA	GCCTCCACCA	AGGGCCCATC	350
GGTCTTCCCC	CTGGCGCCCT	GCTCCAGGAG	CACCTCCGAG	AGCACAGCGG	400
CCCTGGGCTG	CCTGGTCAAG	GACTACTTCC	CCGAACCG		438

(ID. SEC. n° 37)

Proteína de cadena pesada de 11.7.1

VVQPGRSLRL	SCAASGFTFS	SXGMHWVRQA	PGKGLEWVAV	IWSDGSHKYY	50
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGT	MIVVGTLDYW	100
GQGLTVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEP	146

(ID. SEC. n° 11)

DNA de cadena kappa de 11.7.1

ACCCAGTCTC	CATCCTCCCT	GTCTGCATCT	GTAGGAGACA	GAGTCACCAT	50
CACCTGCCGG	GCAAGTCAGA	GCATTTGCAA	CTATTTAAAT	TGGTATCAGC	100
AGAAACCAGG	AAAAGCCCCCT	AGGGTCCTGA	TCTATGCTGC	ATCCAGTTTG	150
CAAGGTGGGG	TCCCGTCAAG	GTTCACTGGC	AGTGGATCTG	GGACAGATTG	200
CACTCTCACC	ATCAGCAGTC	TGCAACCTGA	AGATTTTGCA	ACTTACTACT	250
GTCAACAGAG	TTACACTACC	CCATTCACTT	TCGGCCCTGG	GACCAGAGTG	300
GATATCGAAC	GAACTGTGGC	TGCACCATCT	GTCTTCATCT	TCCCGCCATC	350
TGATGAGCAG	TTGAAATCTG	GAACTGCCTC	TGTTGTGTGC	CTGCTGAATA	400
ACTTCTATCC	CAGAGAGGCC	AAAGTACAGT	GGAAGGTGGA	TAACGCCTAT	450
T					451

(ID. SEC. n° 50)

Proteína de cadena kappa de 11.7.1

TQSPSSLSAS	VGDRVITICR	ASQSICNYLN	WYQOKPGKAP	RVLIYAASSL	50
QGGVPSRFSG	SGSGIDCTLT	ISSLQPEDFA	TYYCQQSYIT	PFTFGPGTRV	100
DIERTVAAPS	VFIFPPSDEQ	LKSGTASVVC	LLNNFYPREA	KVQWKVDNAY	150

(ID. SEC. n° 24)

*Figura 1L*DNA de cadena pesada de 12.3.1.1

TCCTGTGCAG CGTCTGGATT CACCTTCAGT TACTATGGCG

TCTGGGGGAG GCGTGGTCCA GCCTGGGAGG TCCCTGAGAC TCTCCTGTGC 50
 AGCGTCTGGA TTCACCTTCA GTAGCTATGG CGTGCACTGG GTCCGCCAGG 100
 CTCCAGGCAA GGGGCTGGAG TGGGTGGCAG TTATATGGTA TGATGGAAGT 150
 AATAAATACT ATGCAGACTC CGTGAAGGGC CGATTCACCA TCTCCAGAGA 200
 CAATTCCAAG AGCACGCTGT ATCTGCAAAT GAACAGCCTG AGAGCCGAGG 250
 ACACGGCTGT GTATTATTGT GCGAGAGACT CGTATTACGA TTTTGGAGT 300
 GGTGCGGGCG GTATGGACGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC 350
 CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCG CCCTGCTCCA 400
 GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC 450
 TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC TGACCAGCGG 500
 CGTGCACACC TTCCAGCTG TC 522

(ID. SEC. n° 38)

Proteína de cadena pesada de 12.3.1.1

SGGGVVQPGR SLRLSCAASG FTFSSYGVHW VRQAPGKGLE WVAWIWYDGS 50
 NKYYADSVKG RFTISRDN SK STLYLQMN SL RAEDTAVYYC ARDSYDFWS 100
 GRGGMDVWQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY 150
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAV 174

(ID. SEC. n° 12)

DNA de cadena kappa de 12.3.1.1

CCACTCTCCC TGCCCGTCAC CCTTGGACAG CCGGCCTCCA TCTCCTGCAG 50
 GTCTAGTCAA AGCCTCGTAT ACAGTGATGG AACACCTAC TTGAATTGGT 100
 TTCAGCAGAG GCCAGGCCAA TCTCCAAGGC GCCTAATTTA TAAGGTTTCT 150
 AACTGGGACT CTGGGGTCCC AGACAGATTC AGCGGCAGTG GGTCAGGCAC 200
 TGATTTTACA CTGAAAATCA GCAGGGTGGA GGCTGAGGAT GTTGGGGTTT 250
 ATTACTGCAT GCAAGGTTCA CACTGGCCTC CGACGTTCCG CCAAGGGACC 300
 AAGGTGGA AA TCAAACGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT TCATCTTCCC 350
 GCCATCTGAT GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT GTGTGCCTGC 400
 TGAATAACTT CTATCCAC 419

(ID. SEC. n° 51)

Proteína de cadena kappa de 12.3.1.1

PLSLPVTILGQ PASISCRSSQ SLVYSDGNTY LNWFPQRPQ SPRLIYKVS 50
 NWDSGVPDRF SGSGSGTDFT LKISRVEAED VGVYYCMQGS HWPPTFGQGT 100
 KVEIKRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNFFYP 139

(ID. SEC. n° 25)

*Figura 1M*DNA de cadena pesada de 12.9.1.1

GTCCAGCCTG	GGAGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTGCAGCGT	CTGGATTTCAC	50
CTTCAGTAAC	TATGCCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGCAAGGGGC	100
TGGAGTGGGT	GGTAGTTATT	TGGCATGATG	GAAATAATAA	ATACTATGCA	150
GAGTCCGTGA	AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAGAACAC	200
GCTGTATCTG	CAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCTGTATATT	250
ACTGTGCGAG	AGATCAGGGC	ACTGGCTGGT	ACGGAGGCTT	TGACTTCTGG	300
GGCCAGGGAA	CCCTGGTCAC	CGTCTCCTCA	GCCTCCACCA	AGGGCCCATC	350
GGTCTTCCCC	CTGGCGCCCT	GCTCCAGGAG	CACCTCCGAG	AGCACAGCGG	400
CCCTGGGCTG	CCTGGTCAAG	GACTACTTCC	CCGAACCGGT	GACGGTGTCTG	450
TGGAACTCAG	GCGCTCTGAC	CAGCGGCGTG	CACACCTTCC		490

(ID. SEC. n° 39)

Proteína de cadena pesada de 12.9.1.1

VQPGRLRLS	CAASGFTFSN	YAMHWVRQAP	GKGLEWVVVI	WHDGNNKYIA	50
ESVKGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCARDQG	TGWYGGFDFW	100
GQGLTVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	150
WNSGALTSGV	HTF				163

(ID. SEC. n° 13)

DNA de cadena kappa de 12.9.1.1

CCTGGAGAGC	CGGCTTCCAT	CTCTTGACAG	TCTAGTCAGA	GCCTCCTGCA	50
TAGTAATGGA	TACAACTATT	TGGATTGGTA	CCTGCAGAAG	CCAGGACAGT	100
CTCCACAGCT	CCTGATCTAT	TTGGGTTCTA	ATCGGGCCTC	CGGGGTCCCT	150
GACAGGTTCA	GTGGCAGTGG	ATCAGGCACA	GATTTTACAC	TGAAACTCAG	200
CAGAGTGGAG	GCTGAGGATG	TTGGGGTTTA	TTACTGCATG	CAAGCTCTAC	250
AAACTCCTCT	CACTTTCGGC	GGAGGGACCA	AGGTGGAGAT	CAAACGAACT	300
GTGGCTGCAC	CATCTGTCTT	CATCTTCCCG	CCATCTGATG	AGCAGTTGAA	350
ATCTGGAAC	GCCTCTGTTG	TGTGCCTGCT	GAATAACTTC	TATCCCAGAR	400
AGGCCAAAGT	ACATTCCAT				419

(ID. SEC. n° 52)

Proteína de cadena kappa de 12.9.1.1

PGEPAISICR	SSQSLLHSNG	YNYLDWYLQK	PGQSPQLLIY	LGSNRRASGVP	50
DRFSGSGSGT	DFTLKLsrve	AEDVGVYYCM	QALQTPLTFG	GGTKVEIKRT	100
VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	ASVVCLLNNF	YPR		133

(ID. SEC. n° 26)

Figura 2

CDR	DP5 0	3.1.1	4.1.1	4.8.1	4.10. 2	4.13. 1	4.14. 3	6.1.1	11.2. 1	11.6. 1	11.7. 1	12.3. 1.1	12.9. 1.1
								G					
	G	G	G	G	G			G	G	G		G	
	V	V	V	V	V			V	V	V	V	V	
	V	V	V	V	V			V	V	V	V	V	V
	Q	Q	Q	Q	O			E	Q	O	Q	O	O
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	A	A	V	T	V	A	A	T	A	A	A	A	A
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	T	T	T	T	I	T	T	T	T	T	T	T	T
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
CDR 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	N
	Y	Y	H	Y	H	H	H	Y	Y	Y	C	Y	Y
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
	M	M	M	M	I	I	I	M	M	M	M	V	M
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Q	Q	Q	O	O	O	O	Q	O	Q	Q	O	Q
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	G	G	G	G	G	G	G	G	O	G	G	G	G
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	S	Y	H
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
CDR	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	N

Figura 2 (continuación)

CDR	DP5 0	3.1.1	4.1.1	4.8.1	4.10. 2	4.13. 1	4.14. 3	6.1.1	11.2. 1	11.6. 1	11.7. 1	12.3. 1.1	12.9. 1.1
2													
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	H	H	N	N
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	Y	Y	Y	H	D	D	D	H	Y	Y	Y	Y	Y
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	E
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	V	V	V	V	V	V	V	A	V	V	V	V	V
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	N	N	N	N	N	N	K	N	N	N	N	S	N
	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	Y	Y	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
		G	G	G	V	V	V	A	D	G	G	D	D
		A	G	E	A	A	A	G	P	A	T	S	Q
		R	H	R	P	P	P	L	R	V	M	Y	G
		I	F	L	L	L	L	L	G	V	I	Y	T
CDR 3		I	G	G	G	G	G	G	A	V	V	D	G

Figura 2 (continuación)

CDR	DP5 0	3.1.1	4.1.1	4.8.1	4.10. 2	4.13. 1	4.14. 3	6.1.1	11.2. 1	11.6. 1	11.7. 1	12.3. 1.1	12.9. 1.1
		T	P	S	P	P	P	Y	T	P	V	F	W
		P	F	Y	L	L	L	F	L	A	G	W	Y
		C	D	F	D	D	D	D	Y	A	T	S	G
		M	Y	D	Y	Y	Y	Y	Y	M	L	G	G
		D	W	Y	W	W	W	W	Y	D	D	R	F
		V	G	W	G	G	G	G	Y	V	Y	G	D
		W	Q	G	Q	Q	Q	Q	Y	W	W	G	F
		G	G	Q	G	G	G	G	G	G	G	M	W
		Q	T	G	T	T	T	T	M	Q	Q	D	G
		G	L	T	L	L	L	L	D	G	G	V	Q
		T	V	L	V	V	V	V	V	T	T	W	G
		T	T	V	T	T	T	T	W	T	L	G	T
		V	V	T	V	V	V	V	G	V	V	Q	L
		T	S	V	S	S	S	S	Q	T	T	G	V
		V	S	S	S	S	S	S	G	V	V	T	T
		S	A	S	A	A	A	A	T	S	S	T	V
		S	S	A	S	S	S	S	T	S	S	V	S
		A	T	S	T	T	T	T	V	A	A	T	S
		S	K	T	K	K	K	K	T	S	S	V	A
		T	G	K	G	G	G	G	V	T	T	S	S
		K	P	G	P	P	P	P	S	K	K	S	T
		G	S	P	S	S	S	S	S	G	G	A	K
		P	V	S	V	V	V	V	A	P	P	S	G
		S	F	V	F	F	F	F	S	S	S	T	P
		V	P	F	P	P	P	P	T	V	V	K	S
		F	L	P	L	L	L	L	K	F	F	G	V
		P	A	L	A	A	A	A	G	P	P	P	F
		L	P	A	P	P	P	P	P	L	L	S	P
		A	C	P	C	C	C	C	S	A	A	V	L
		P	S	C	S	S	S	S	V	P	P	F	A
		C	R	S	R	R	R	R	F	C	C	P	P
		S	S	R	S	S	S	S	P	S	S	L	C
		R	T	S	T	T	T	T	L	R	R	A	S
		S	S	T	S	S	S	S	A	S	S	P	R
		T	E	S	E	E	E	E	P	T	T	C	S
		S	S	E	S	S	S	S	C	S	S	S	T
		E	T	S	T	T	T	T	S	E	E	R	S
		S	A	T	A	A	A	A	R	S	S	S	E
		T	A	A	A	A	A	A	S	T	T	T	S
		A	L	A	L	L	L	L	T	A	A	S	T
		A	G	L	G	G	G	G	S	A	A	E	A
		L	C	G	C	C	C	C	E	L	L	S	A
		G	L	C	L	L	L	L	S	G	G	T	L
		C	V	L	V	V	V		T	C	C	A	G
		L	K	V	K	K	K		A	L	L	A	C
		V	D	K	D	D	D		A	V	V	L	L
		K	Y	D	Y	Y	Y		L	K	K	G	V
		D	F	Y	F	F	F		G	D	D	C	K

Figura 2 (continuación)

CDR	DP5 0	3.1.1	4.1.1	4.8.1	4.10. 2	4.13. 1	4.14. 3	6.1.1	11.2. 1	11.6. 1	11.7. 1	12.3. 1.1	12.9. 1.1
		Y	P	F	P	P	P		C	Y	Y	L	D
		F	E	P	E	E	E		L	F	F	V	Y
		P	P	E	P	P	P		V	P	P	K	F
		E	V	P	V	V	V		K	E	E	D	P
		P	T	V	T	T	T		D	P	P	Y	E
		V	V	T	V	V	V		Y	V		F	P
		T	S	V	S	S	S		F	T		P	V
		V	W	S	W	W	W		P	V		E	T
		S	N	W	N	N	N		E			P	V
		W	S	N	S	S	S		P			V	S
		N	G	S	G	G	G		V			T	W
		S	A	G	A	A	A		T			V	N
		G	L	A	L	L	L		V			S	S
		A	T	L	T	T	T		S			W	G
		L	S	T	S	S	S		W			N	A
		T	G	S	G		G		N			S	L
		S	V	G	V		V		S			G	T
		G	H	V	H		H		G			A	S
		V	T	H	T		T		A			L	G
		H	F	T	F		F		L			T	V
		T	P	F	P		P		T			S	H
		F	A	P	A		A		S			G	T
		P	V	A	V		V		G			V	F
		A	L	V	L		L		V			H	
		V	Q		Q		Q		H			T	
		L										F	
		Q										P	
												A	
												V	

Figura 3

Producto del gen DP-65 ó 4-31
VSGGSISGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGVIVYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR
CDR1 CDR2

Proteína de cadena pesada de 2.1.3
SGPGLVKPSQLSLTCTVSGGSISGGHYWSWIRQHPGKGLEWIGVIVYIGNTYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR
CDR1 CDR2
DSGDYYGIDYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPCRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
CDR3

Figura 4

Producto del gen A27

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSYVSSSYLA WYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSP
 CDR1 CDR2 CDR3

Proteína de cadena kappa de 4.1.1

QSPGTLSPGERATLSCRASQSYSSSSELA WYQQRPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGINSPWT
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK

Proteína de cadena kappa de 4.8.1

QSPGTLSPGERATLSCRISMYSSSYLA WYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGISPET
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

Proteína de cadena kappa de 4.14.3

GTLSLSPGERATLSCRASQSYSSSYLA WYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGRSPET
 CDR1 CDR2 CDR3
 FPGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

Proteína de cadena kappa de 6.1.1

QSPGTLSPGERATLSCRASQSYSSSYLA WYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGISPET
 CDR1 CDR2 CDR3
 FPGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

Proteína de cadena kappa de 4.10.2

SPGTLSPGERATLSCRASQSYSSSSELA WYQQKPGQAPRLIYESSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFALYYCQOYGTSPET
 CDR1 CDR2 CDR3
 FPGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

Proteína de cadena kappa de 4.13.1

QSPGTLSPGERATLSCRASQSYSSSYLA WYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGRSPET
 CDR1 CDR2 CDR3
 FPGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKGG

Figura 5

Producto del gen 012
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISSTLYLWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTIDFTLTSSLPEDFATYYCQQSYSTPEI
 CDR1 CDR2 CDR3

Proteína de cadena kappa de 3.1.1
 QSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNTLYLWYQQKPKAPNFIATSILOSGVPSRFRSGSGTINFILTINSLHPEDFATYYCQQSYSTPEI
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

Proteína de cadena kappa de 11.2.1
 PSSLSASVGDRVTITCRASQISNTLYLWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGTIDFTLTSSLPEDFATYYCQQSYSTPEI
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV

Proteína de cadena kappa de 11.6.1
 TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISRYLWYQQKPKAPKFLIYYASIILOSGVPSRFSGSGTIDFTLTSSLPEDFATYYCQQSYSTPEI
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN

Proteína de cadena kappa de 11.7.1
 TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNTLYLWYQQKPKAPRVLIIYAASSLQSGVPSRFSGSGTIDFTLTSSLPEDFATYYCQQSYSTPEI
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGPGTRVDIERTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAY

Figura 6

Producto génico de A10/A26

EVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSEGVPSRFSGSGTDFILTNSLEAEDAATYYCHQSSSLPQ

CDR1

CDR2

CDR3

Proteína de cadena kappa de 2.1.3

SPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSEGVPSRFSGSGTDFILTNSLEAEDAATYYCHQSSSLPLT

CDR1

CDR2

CDR3

FGGGTIKVEIKRTVAAPSVFIEPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE

Figura 7

Producto del gen A17

DVVMTQSP~~LSLPVT~~LGQPASISCRSSQSLVYSDGNITYLNWFQQRPGQSPRLIYKVSNRDSGVDRFSGSGTIDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHWP
 CDR1 CDR2 CDR3

Proteína de cadena kappa de 12.3.1

PLSLPVT~~LGQPASISCRSSQSLVYSDGNITYLNWFQQRPGQSPRLIYKVSNRDSGVDRFSGSGTIDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGS~~HWPET
 CDR1 CDR2 CDR3
 FGQGIKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP

Figura 8

<u>Producto génico de A3/A19</u>	
DIVMTQSP ^{CDR1} LSLPVTPGEPASISCRSSQSLH ^{CDR1} SN ^{CDR2} GYNYLDWYLQKPGQSPQLLYLGSN ^{CDR2} RASGV ^{CDR3} PD ^{CDR3} RFSGSGSDFTL ^{CDR3} KL ^{CDR3} SRVEAEDVG ^{CDR3} VY ^{CDR3} CMQALQIT ^{CDR3}	
<u>Proteína de cadena kappa de 12.9.1</u>	
PGEPASISCRSSQSLH ^{CDR1} SN ^{CDR1} GYNYLDWYLQKPGQSPQLLYLGSN ^{CDR2} RASGV ^{CDR2} PD ^{CDR2} RFSGSGSDFTL ^{CDR2} KL ^{CDR2} SRVEAEDVG ^{CDR2} VY ^{CDR2} CMQALQIT ^{CDR2} LI ^{CDR2}	
FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP ^{CDR3} R	

Figura 9**Análisis de la secuencia de aminoácidos amino-terminal**

Hibridoma	Cadena ligera	Peso molecular (P.m.)
CT2.1.3	No realizado (N.R.)	N.R.
CT3.1.1	NH ₂ -DIQMTQSPSSLSASVGDRV	26.119
CT4.1.1	NH ₂ -EIVLTQSPGTLSPGERAT	23.917
CT4.8.1	NH ₂ -EIVLTQSPGTLSPGERAT	23.617
CT4.9.1	NH ₂ -DIQMTQSPSSVSASVGDRV	23.702
CT4.10.2	NH ₂ -TGEFVLTQSPGTLSPGER (60%) NH ₂ -EFVLTQSPGTLSPGERAT (40%)	24.101
CT4.14.3	NH ₂ -EIVLTQSPGTLSPGERAT	23.770
CT4.13.1	NH ₂ -EIVLTQSPGTLSPGERAT	23.802
CT6.1.1	NH ₂ -EIVLTQSPGTLSPGERAT	23.747

Hibridoma	Cadena pesada	P.m.
CT2.1.3	N.R.	N.R.
CT3.1.1	NH ₂ -bloqueado. Después del tratamiento con piroglutamato aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (secuencia principal ~ 80%) NH ₂ -PEVQF... (secuencia secundaria ~ 20%)	51.813
CT4.1.1	NH ₂ -bloqueado. Después del tratamiento con piroglutamato aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (secuencia principal ~ 65%) NH ₂ -PEVQFNWYVD... (secuencia secundaria ~ 35%)	51.502
CT4.8.1	NH ₂ -bloqueado. Después del tratamiento con piroglutamato aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPG(R)SL... (secuencia principal ~ 60%) NH ₂ -PEVQFNWY... (secuencia secundaria ~ 40%)	51.597
CT4.9.1	NH ₂ -EVQLLES GGGLVQPGGSLRL (extremo aminico libre)	51.437
CT4.10.2	NH ₂ -bloqueado. Después del tratamiento con piroglutamato aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (secuencia principal ~ 60%) NH ₂ -PEVQFNWYVD... (secuencia secundaria ~ 40%)	51.502
CT4.14.3	NH ₂ -bloqueado. Después del tratamiento con piroglutamato aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSL(R)(L)(S) (secuencia principal ~ 65%) NH ₂ -PEVQFNWYV... (secuencia secundaria ~ 35%)	51.293
CT4.13.1	NH ₂ -bloqueado. Después del tratamiento con piroglutamato aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (secuencia principal ~ 75%) NH ₂ -PEVQFN... (secuencia secundaria ~ 25%)	51.305
CT6.1.1	NH ₂ -bloqueado. Después del tratamiento con piroglutamato aminopeptidasa: NH ₂ -pQ-VQLVESGGGVVEPGRSLRLS* (secuencia principal ~ 65%) NH ₂ -PEVQFNWYVD... (secuencia secundaria ~ 35%)	51.476

* Esta secuencia de cadena pesada es similar a las otras secuencias de cadena pesada bloqueadas salvo por un cambio Gln → Glu único en la posición 13

Figura 10A

anticuerpo	Conc. (mg/ml) (Fc = 1,58)		IEF	SDS-PAGE		SEC	MALDI comunicado		Sec. N-terminales (CL)*	
	comunicado	observado		(+) b-me	(-) b-me		CP	CL	comunicado	observado
CT3.1.1	1,1	1,57	mancha	50 y 28 kDa	6 bandas	139.400	51.813	26.119	DIQMTQSP	DIQMTQSP
CT4.1.1	1,54	1,65	mancha	50 y 24 kDa	6 bandas	79.900	51.502	23.917	EIVLTQSP	EIVLTQSP
CT4.8.1	1,52	1,54	4 bandas	50 y 24 kDa	6 bandas	110.300	51.597	23.617	EIVLTQSP	EIVLTQSP
CT4.10.2	1,29	1,77	4 bandas	50 y 25 kDa	6 bandas	107.200	51.502	24.101	**	***
CT4.14.3	1,75	1,65	mancha	50 y 24 kDa	6 bandas	82.800	51.293	23.770	EIVLTQSP	EIVLTQSP
CT6.1.1	1,36	1,3	4 bandas	50 y 24 kDa	6 bandas	101.100	51.476	23.747	EIVLTQSP	EIVLTQSP
* todas las cadenas pesadas N-terminalmente bloqueadas (no doméesticamente secuenciadas)										
** secuencia mixta comunicada: TGEFVLTQSP (60) y EFVLTQSP (40)										
*** secuencia mixta observada: TGEFVLTQSP (60) y EFVLTQSP (40)										

1 unidad de densidad óptica a 280 nm = 0,633 mg/ml
 Factor de conversión = 1,58

Figura 10B

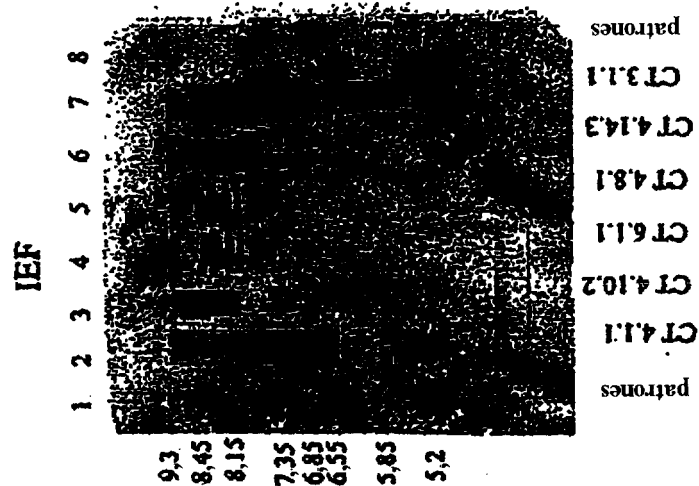


Figura 10C

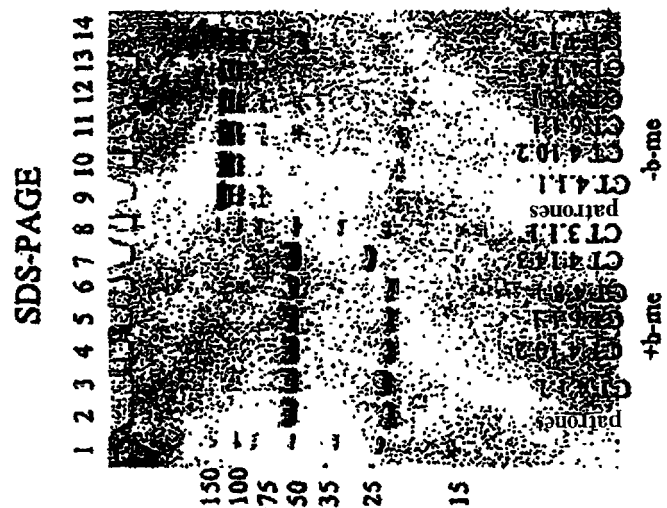


Figura 10D

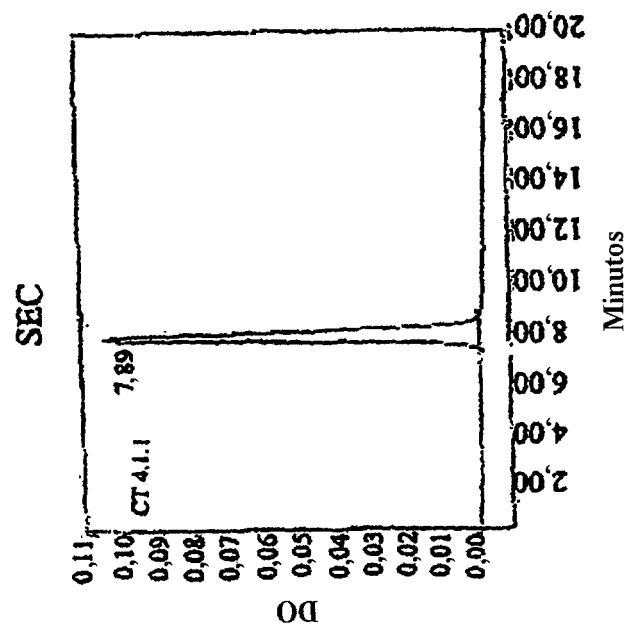


Figura 11A

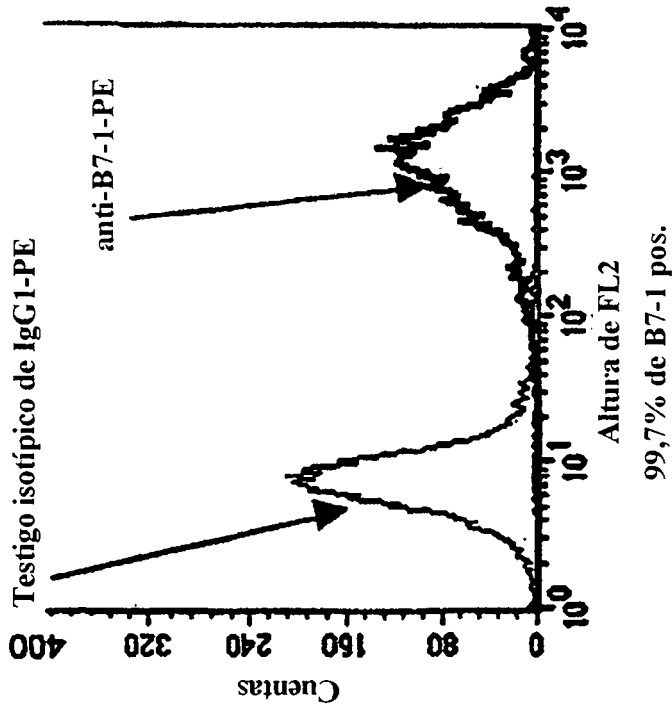
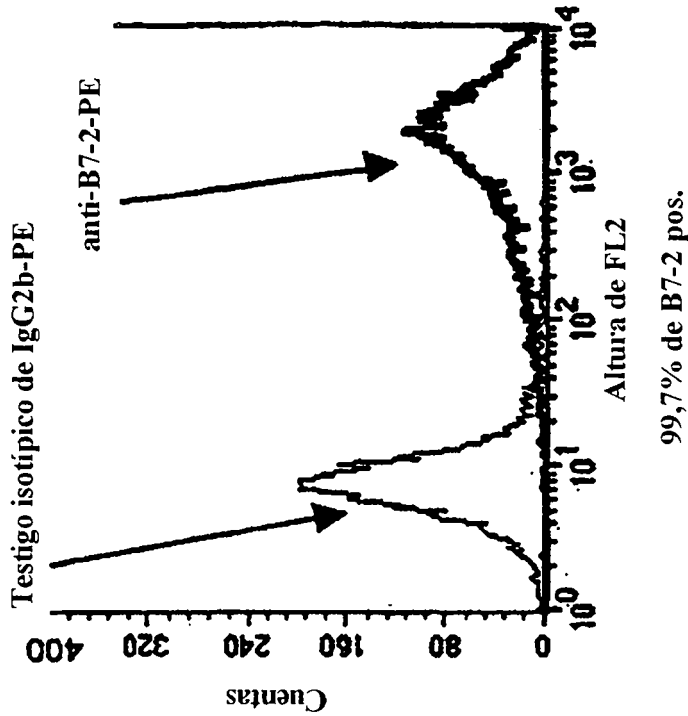


Figura 11B



Expresión de B7-1 y B7-2 en células Raji

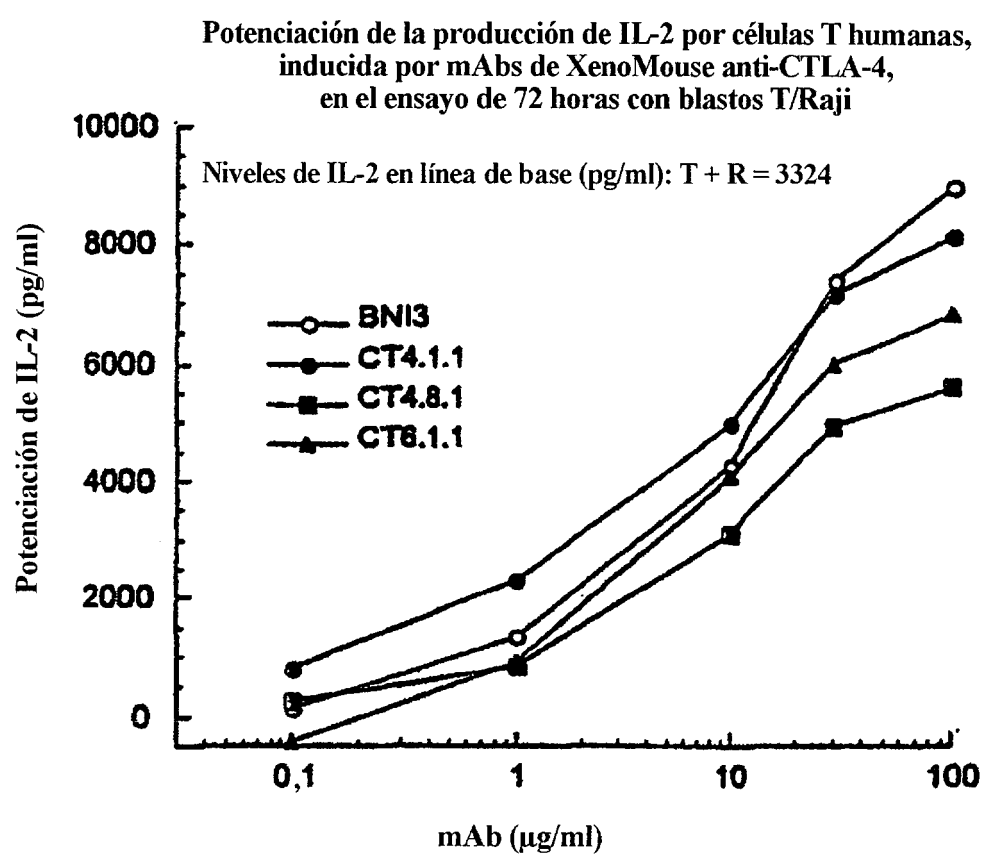
Figura 12

Figura 13

**Potenciación de la producción de IFN- γ por células T humanas,
inducida por mAbs de XenoMouse anti-CTLA-4,
en el ensayo de 72 horas con blastos T/Raji**

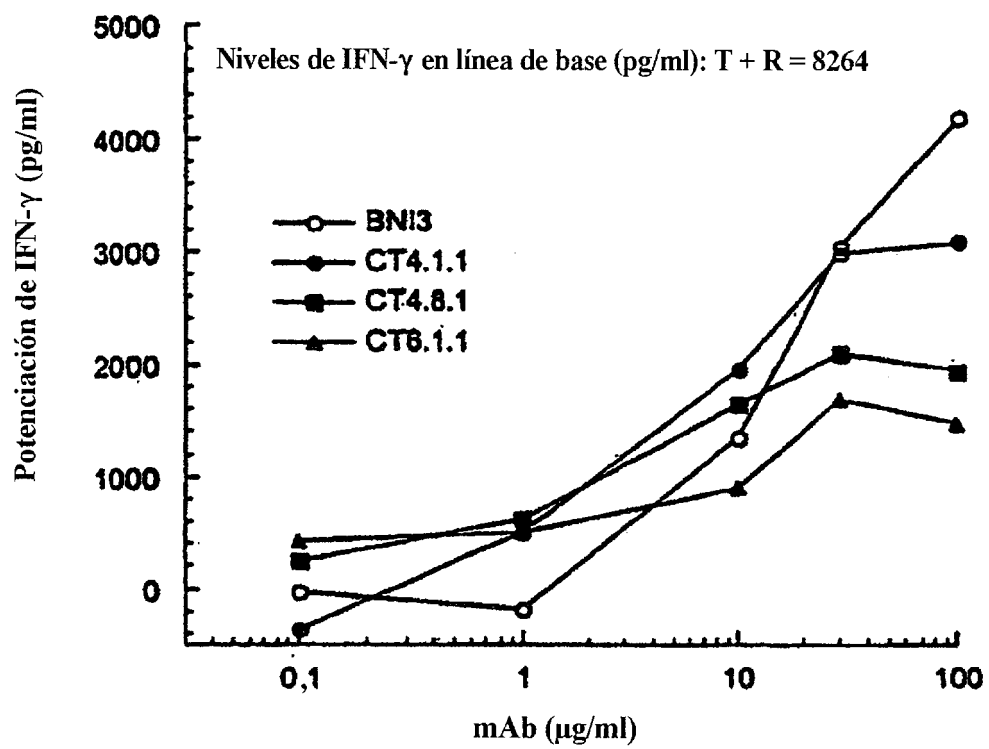


Figura 14

**Potenciación de la producción de IL-2 por células T humanas,
inducida mediante mAbs de XenoMouse anti-CTLA-4,
en el ensayo de 72 horas con blastos T/Raji (6 donantes)**

Niveles de IL-2 en línea de base (pg/ml): T + R = 9187; T + R + IgG2a = 9389; T + R + IgG2 = 8509

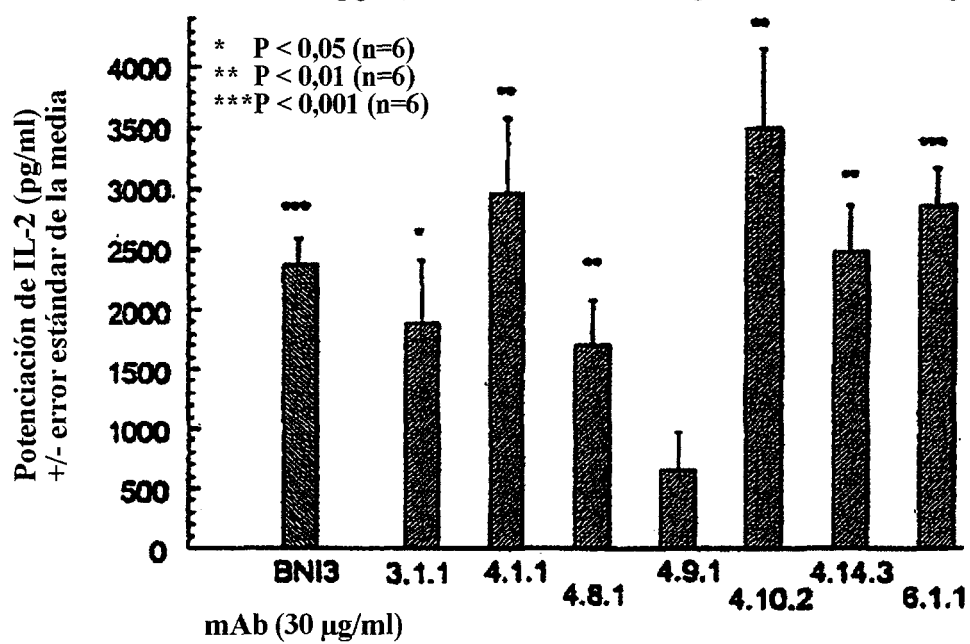


Figura 15

**Potenciación de la producción de IFN- γ por células T humanas,
inducida por mAbs de XenoMouse anti-CTLA-4,
en el ensayo de 72 horas con blastos T/Raji (6 donantes)**

Niveles de IFN- γ en línea de base (pg/ml): T + R = 4780; T + R + IgG2a = 4868; T + R + IgG2 = 4331

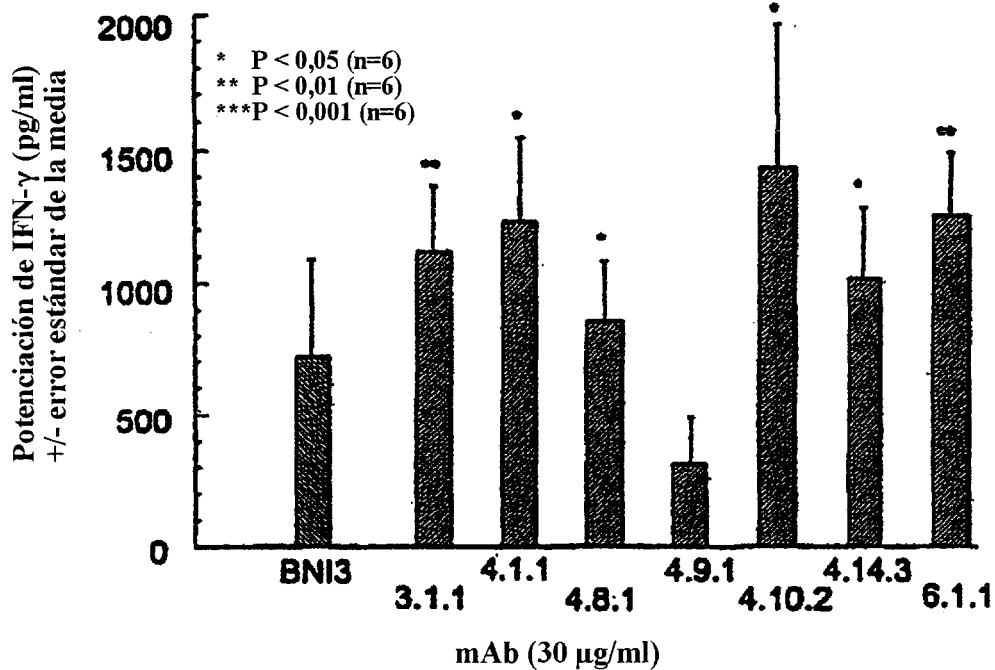


Figura 16

Potenciación de la producción de IL-2, inducida por la unión del mAb CT4.1.1 anti-CTLA-4 (30 µg/ml) a PBMCs humanas estimuladas con SEA (100 ng/ml) más mAb anti-CD3 (60 ng/ml)

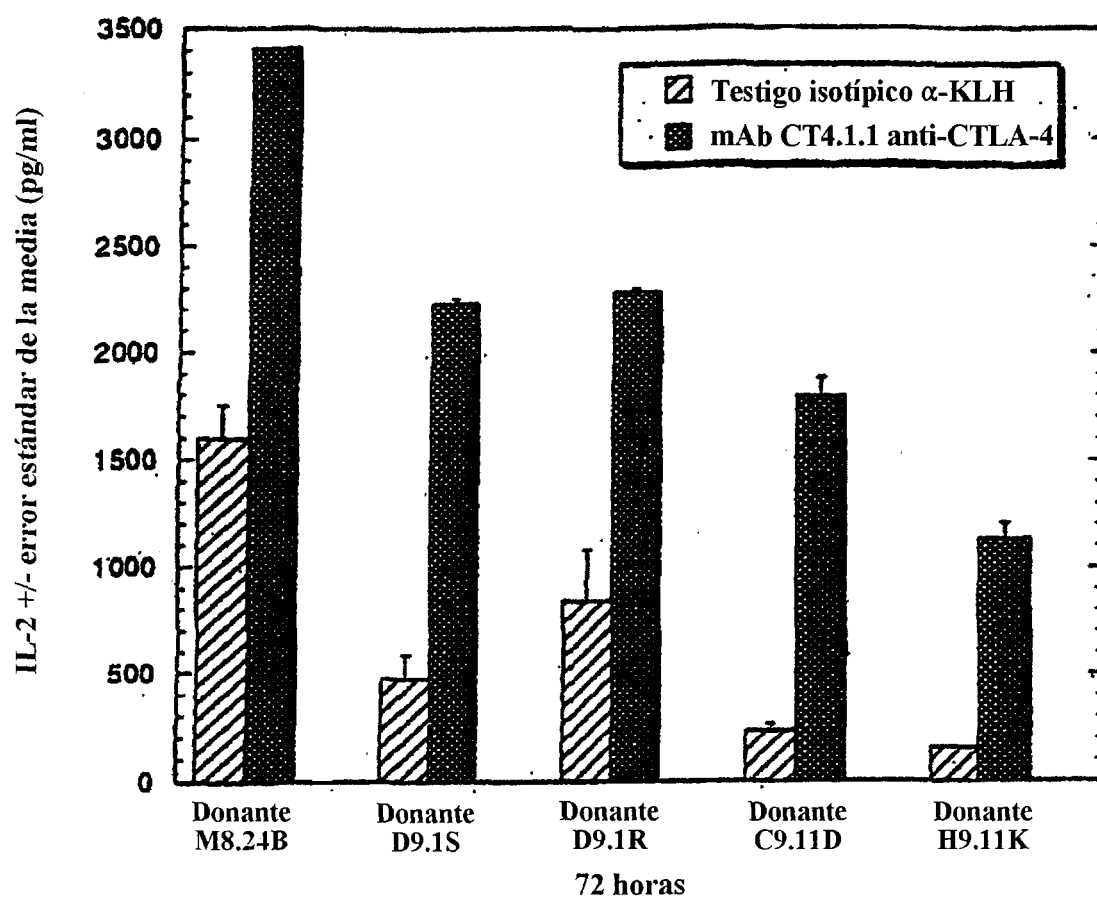


Figura 17

Potenciación de la producción de IL-2, inducida por mAbs anti-CTLA-4 (30 µg/ml) en sangre completa humana estimulada con SEA (100 ng/ml) más mAb anti-CD3 (60 ng/ml)

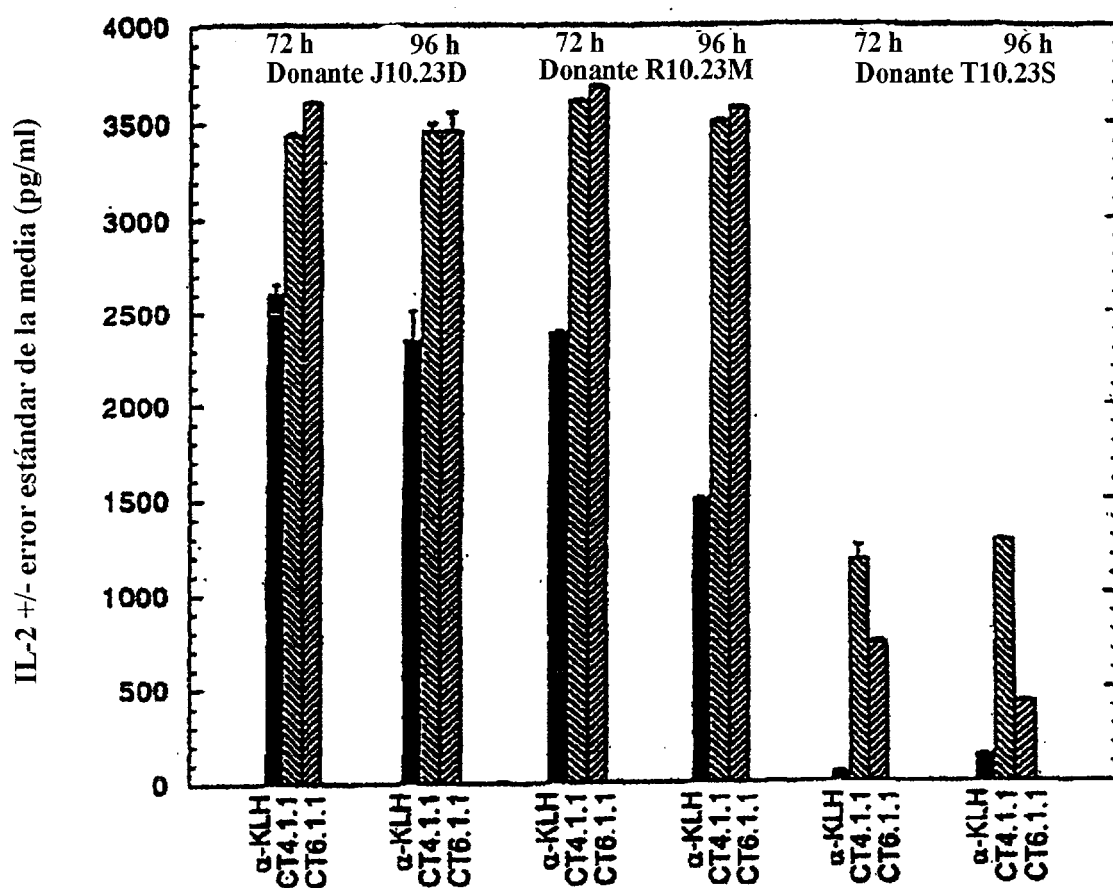
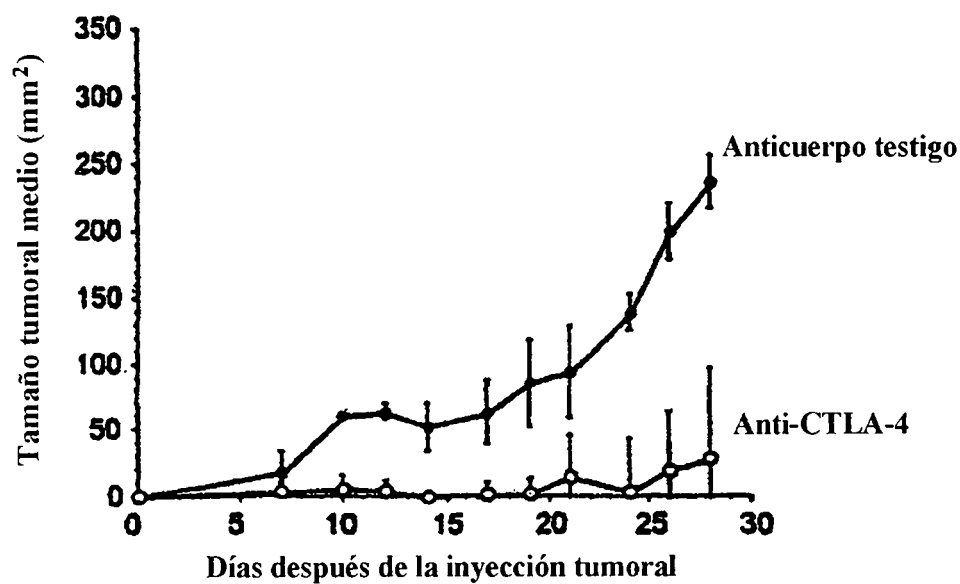


Figura 18

Anti-CTLA-4 murino inhibe el crecimiento tumoral en ratones



Se administró el tratamiento los días 0, 4
7 y 14 después de la estimulación tumoral

Figura 19

Potenciación de la producción de IL-2, inducida por mAbs anti-CTLA-4 (30 µg/ml) en los ensayos de superantígeno y 72 horas con blastos T/Raji (6 donantes)

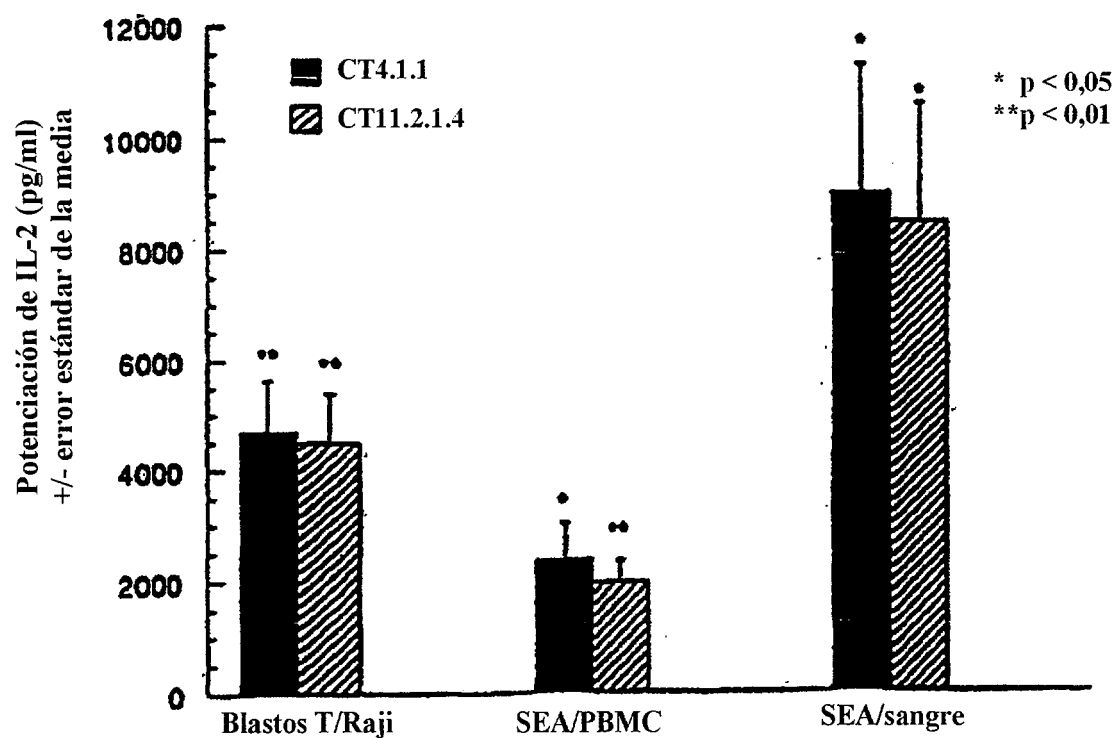


Figura 20

Potenciación de la producción de IL-2 por células T humanas, inducida por mAbs anti-CTLA-4 en el ensayo de 72 horas con blastos T/Raji

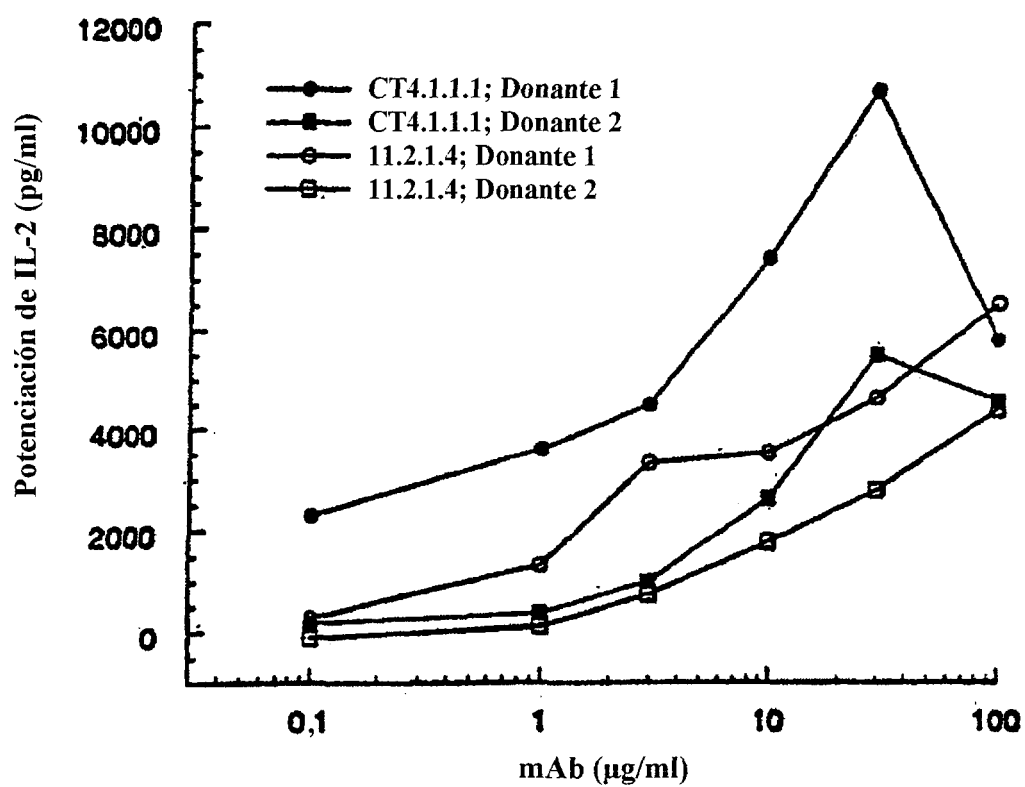
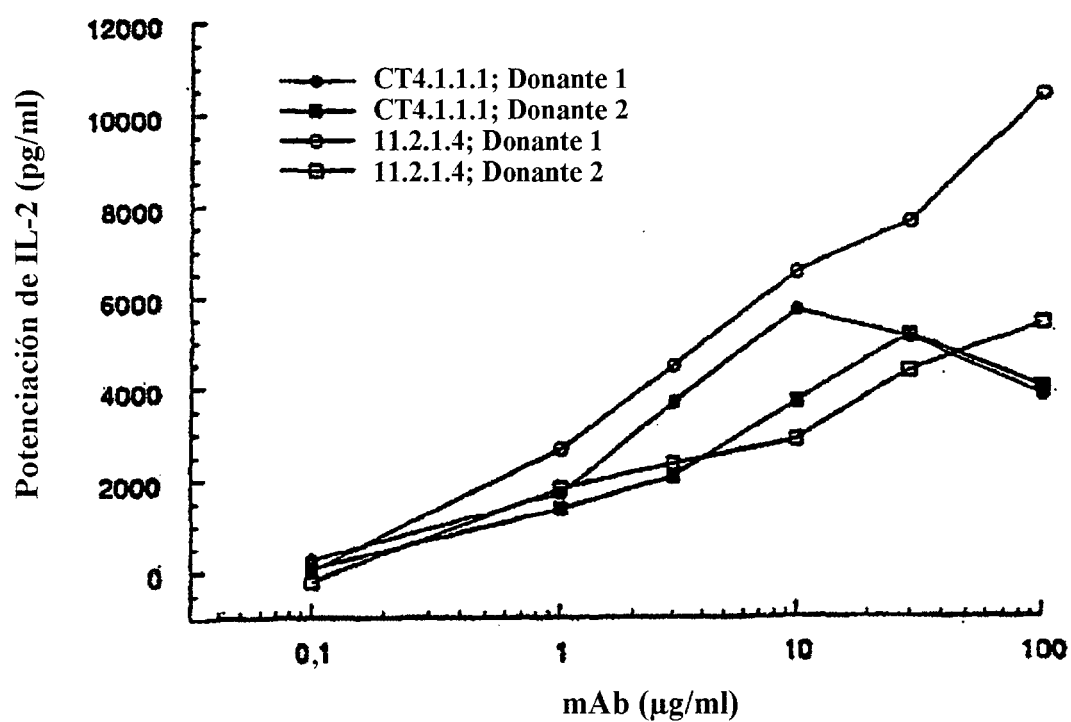


Figura 21

Potenciación de la producción de IL-2, inducida por mAbs anti-CTLA-4 en sangre completa estimulada con superantígeno (100 ng/ml)



- Los péptidos señal se muestran en negrita y texto grande
- El marco de lectura abierto para el clon genómico está subrayado
- Las mutaciones introducidas para preparar el Ab desglucosilado (N294Q) están doblemente subrayadas y en texto grande

Figura 22A cDNA de cadena pesada de IgG2 4.1.1

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC
CATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTCACTT
CGGTCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCAG
CTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCAC
CGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACG
TTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (ID. SEC. n° 53)

Figura 22B DNA genómico de cadena pesada de IgG2 4.1.1

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTCACTTCAGTAGC
CATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGGAAGAAATATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTCACTT
CGGTCTCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCAACGCTCTCTCAGCTA
GCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTGCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCAG
CTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAACTTCGGCAGCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGGTGAGAGGCCAGCTCAGGGAGGGAGGG
TGTTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCTGCTGGACGCACCCCGGTGTGC
AGCCCCAGCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCATCTGTCTCTCACCAGGAGGC
CTCTGCCCCGCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCACCA
GGCTCCAGGCAGGCACAGGCTGGGTGCCCTACCCAGGCCCTTACACACAG
GGGCAGGTGCTTGGCTCAGACCTGCCAAAAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCC
CCTGACCTAAGCCGACCCCAAAGGCCAAACTGTCCACTCCCTCAGCTCGGACA
CCTTCTCTCTCCAGATCCGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCGCA
AATGTTGTGTGAGTGCCCAACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCCTCGCCC
TCCAGCTCAAGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGC
CCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTCTCTCAGCAECACCTGTG
GCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGAT
CTCCCCGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACC
CCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCTGTGGTCAAGCTCCT
CACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGT
GGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCAATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCAACCT
CTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGA
GAACCAACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGCTCCGGGTAAATGA

(ID. SEC. n° 54)

Figura 22C Proteína de cadena pesada de IgG2 4.1.1

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCVASGFTFSS
HGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGRNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMN
SLRAEDTAVYYCARGGHFGPFDYWQGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFP
SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
FRVVSVLTVVHODWLNKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPOVYITLP
PSRERMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMQLDSGSSF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

(ID. SEC. n° 63)

Figura 22D cDNA N294Q de cadena pesada de IgG2 4.1.1

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC
CATGGCATGCAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTCACTT
CGGTCTTTTGA TACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTGCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAG
CTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCAC
CGTGCCCAAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCCAAGCAGC
TTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGASAAAA
CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATCACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTCGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (ID. SEC. nº 55)

Figura 22E Proteína N294Q de cadena pesada de IgG2 4.1.1

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPRSLRLSCVASGFTFSS
HGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGRNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMN
SLRAEDTAVYYCARGGHFGPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVPPLAPCSRSTS
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVF
SSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPFCPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQST
FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF
PSREBMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRNQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (ID. SEC. nº 64)

Figura 22F DNA de cadena kappa de 4.1.1

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC
CAGATACCAACCGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT
TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGC
AGCAGCTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT
CATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCA
GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGAT
TTTGCAGTGATTACTGTGACAGTATGGTACCTCACCCTGGACGTTTCGGCCA
AGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT
TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC
AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (ID. SEC. n° 56)

Figura 22G Proteína de cadena kappa de 4.1.1

METPAQLLFLLLWLDPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSI
SSFLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED
FAVYYCQQYGTSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL
LNNFYPRFAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. SEC. n° 65)

Figura 22H DNA de cadena pesada de 4.8.1

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAAC
TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAACACTATGGAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTACCATCTCCAGTGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGAGAGACT
GGGTCTCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACGCTCTCCTCAG
CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACC
TCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
GGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCC
CAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAAAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCC
CACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCA
AAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGT
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC
ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGTGTGACCAGGACTGGCTGAACGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTG
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGACAACATAAGACCAACCTCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCCTCTACGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (ID. SEC. n° 57)

Figura 22I Proteína de cadena pesada de 4.8.1

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSN
YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSGNKHGDSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCARGERLGSYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK (ID. SEC. n° 66)

Figura 22J DNA de cadena kappa de 4.8.1

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC
CAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTT
TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTGTTAGCAGCAGT
TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTA
TGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA
GTCTATTACTGTCAGCAGTATGGCATCTCACCCTTCACTTTTCGGCGGAGGGAC
CAAGGTGGAGATCAAGCGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC
CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
AACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCA
ATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (ID. SEC. n° 58)

Figura 22K Proteína de cadena kappa de 4.8.1

METPAQLLFLLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRTSVSSS
YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA
VYYCQQYGISPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. SEC. n° 67)

Figura 22L DNA de cadena pesada de 6.1.1

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
 GTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCGAGC
 CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGT
 TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
 AGTTATATGGTATGATGGAAGCAATAAACACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCC
 GATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC
 AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGGACTGCT
 GGGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCT
 CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
 GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
 GACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAG
 CTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
 TCCAGCAACTTCGGCACCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
 CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCAC
 CGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA
 CCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGT
 GGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGC
 TTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
 GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAA
 CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC
 CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGCTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
 AGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
 TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (ID. SEC. n° 59)

Figura 22M Proteína de cadena pesada de 6.1.1

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVEPGRSLRLSCTASGFTFSS
 YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKHYADSAKGRFTISRDNKNTLYLQMN
 SLRAEDTAVYYCARAGLLGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
 ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 FRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (ID. SEC. n° 68)

Figura 22N DNA de cadena kappa de 6.1.1

**ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC
CAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTT
TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAAAGTGTTAGC
AGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCCCTCAT
CTATGGTGTATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTAGTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT
GCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTATCTCACCATTCACTTTCGGCCCTGG
GACCAAAGTGGATATCAAACGAACGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCT
CCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA
CCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (ID. SEC. n° 60)**

Figura 22O Proteína de cadena kappa de 6.1.1

**METPAQLLFLLLLWLDPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS
SYLAWYQKPGQAPRPLIYGVSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF
AVYYCQQYGISPFETFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. SEC. n° 69)**

Figura 22P DNA de cadena pesada de IgG2 11.2.1

**ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG
GTGTCCAGTGTGAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC
TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGAGGGG
AGCTACCCTTTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCA
CGGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG
CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA
GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCA
GCGGCGTGACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTG
CAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCA
AATGTTGTGTGAGTGGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTACAGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGG
GAGGAGCAGTTCACAGCACGTTCCGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CCAGGAGTGGTGAACCGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCC
TCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA**

(ID. SEC. n° 61)

Figura 22Q Proteína de cadena pesada de IgG2 11.2.1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLY
YYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK (ID. SEC. nº 70)

Figura 22R DNA de cadena kappa de IgG2 11.2.1

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCT
GGCTCCGAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC
CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAG
CATTACAGCTATTTAGATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAAC
TCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACT
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGA
AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGTATTACAGTACTCCATTCACTTTTCG
GCCCTGGGACCAAAGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTG
CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA
GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG
TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGTGA (ID. SEC. nº 62)

Figura 22S Proteína de cadena kappa de IgG2 11.2.1

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEI
KRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (ID. SEC. nº 71)