



No. 11-124710-00000-0000

Fecha: 2011-09-23 15:07:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 281



No. 11-124710-00000-0000

Fecha: 2011-09-23 15:07:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 282

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE SE UNEN A CD19 Y SUS USOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/2871. SOLICITANTE GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.DOMICILIO LA CHAU-De-Fonds, Suiza74. APODERADO GERMAN CASTILLO GRAU

22. BOGOTÁ, D.C., _____

PETIT



No. 11-124710-00000-0000

Fecha: 2011-09-23 15:07:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 281

ción



No. 11-124710-00000-0000

Fecha: 2011-09-23 15:07:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 282**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTES

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capítulo I☐ Capítulo II

2

SOLICITANTE

Nombre: **GLENMARK
PHARMACEUTICALS S.A.**Dirección: **Chemin de la Combetta, 5**Nacionalidad o Domicilio: **La Chaux-De-Fonds,
Suiza**Lugar de Constitución: **Suiza**

Teléfono: Fax:

E- mail:

IDENTIFICACION

☐ C.C.☐ NIT☐ C.E.☐ Otro

Cual

Número

3

REPRESENTANTE O
APODERADONombre: **GERMAN CASTILLO GRAU**Dirección: **Carrera 13 No. 37 - 43 Piso 12**Teléfono: **285 7460** Fax: **285 9267**E- mail: **info@castillograu.com**

IDENTIFICACIÓN

☒ C.C.☐ NIT☐ C.E.☐ Otro

Cual

Número

17.017.671

TF 2.978

de Bogotá

del C.S.J

4

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: **Stanislas Blein; Darko Skegro; Christophe Debonneville; Martin
Bertschinger**Dirección: **Chemin de la Combetta, 5**Nacionalidad o Domicilio: **La Chaux-De-Fonds, Suiza**

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2010/000353Fecha Febrero 23, 2010Publicación Internacional No. WO 2010/095031 A2Fecha Agosto 26, 2010

6

Título (54)

ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE SE UNEN A CD19 Y SUS USOS

7

Clasificación Internacional (51)

C07K 16/28

8

Prioridad

☒ SI ☐ NO

(33) País de Origen

E.U.A.

(32) Fecha

Febrero 23, 2009

(31) Número de Solicitud

61/154.524

9

Comprobante de pago No.

93726

Fecha

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

✓

	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☒ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☐ PCT	
(21) No. De solicitud	(51) int. Cl: C07K 16/28	
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.	
(30) Prioridad	(72) Interventor (es)	
(31) No. Prioridad 61/154.524	Stanislas Blein; Darko Skegro; Christophe Debonneville; Martin Bertschinger	
(32) Fecha: Febrero 23, 2009		
(33) Pais E.U.A.	(74) Apoderado (s) GERMAN CASTILLO GRAU	
(54) Título ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE SE UNEN A CD19 Y SUS USOS		
<i>Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT</i>		
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional		
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud Fecha Febrero 23, 2010 No. de solicitud PCT PCT/IB2010/000353	(87) Publicación internacional Fecha Fecha (Agosto 26, 2010) No. Publicación WO 2010/095031 A2	
Resumen reivindicación (es): La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que se unen al CD19 humano; más específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.		

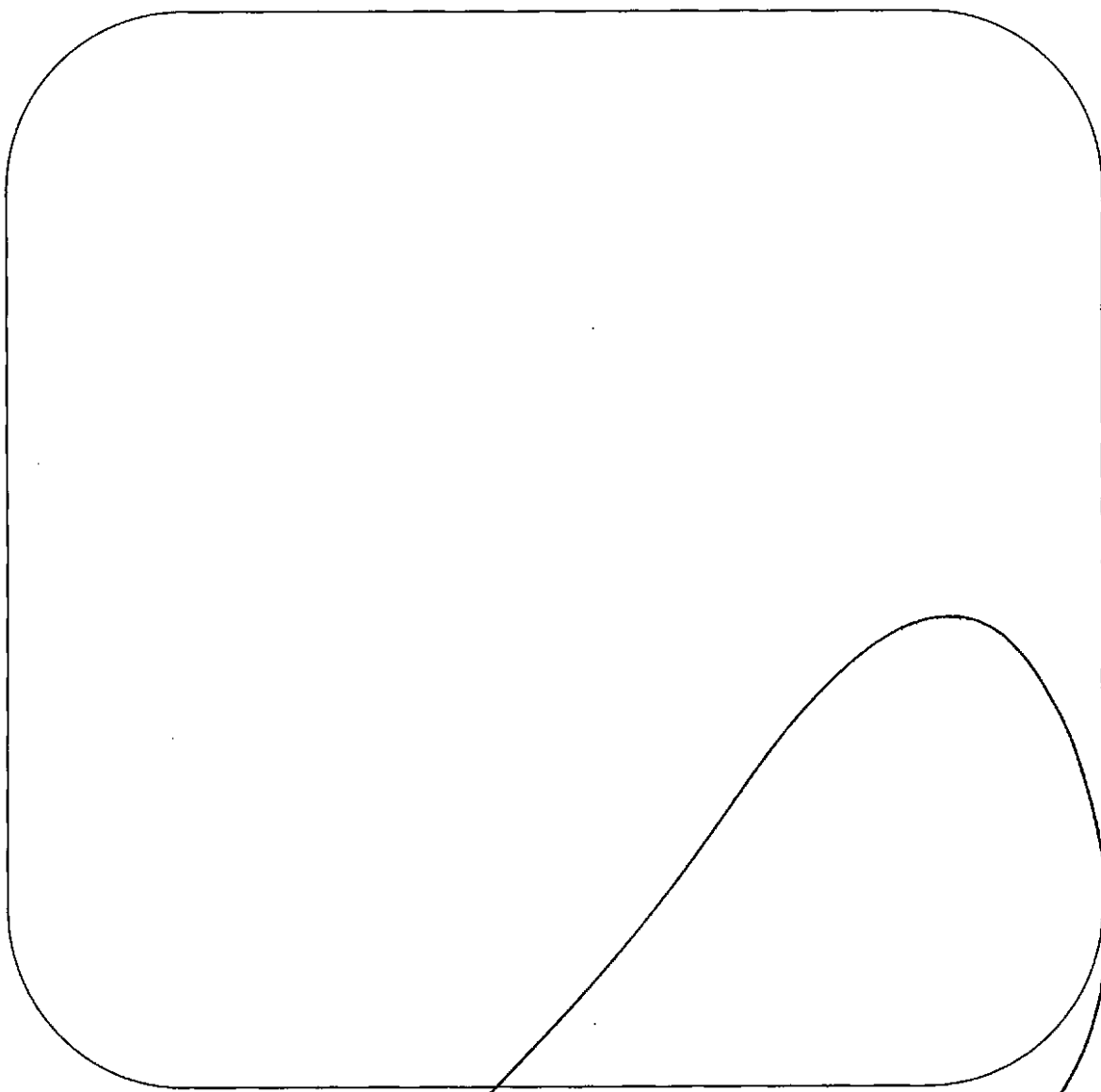
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Copia Auténtica**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la (IPEA)
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA:

C.C.

17.017.671 de
Bogotá

TP

2.978
de C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

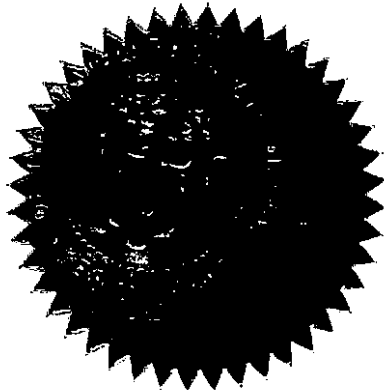
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
KATHLEEN A DONOVAN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
COUNTY CLERK
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
COUNTY OF BERGEN

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 2ND DAY OF JULY 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A296133
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow

Castillo Grau & Associates

Law Offices
P.O. Box 251473
Bogotá, Colombia

FOR PATENTS AND TRADEMARKS IN

COLOMBIA

PODER GENERAL

(1) GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

domiciliado en (2) Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-De-Fonds-Suiza

nombra al Dr. Germán Castillo Grau y/o Adriana Castillo Gibsone y/o Luis Felipe Castillo Gibsone

con oficinas en la Carrera 13 No. 37-43, Piso 12 en Bogotá, D.C., Colombia como sus representantes con poder especial amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades Colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en primera o segunda instancia, la Obtención de Patentes de Invención, Registro de Marcas, de Diseños Industriales, de Nombres y Enseñas Comerciales, lo mismo que traspasos, extensiones, renovaciones, cambios de nombre y domicilio, registro de licencias de explotación y registro de licencias de uso referentes a tales actuaciones, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar la aplicación de medidas cautelares, aceptar en nuestro nombre y representación la Cesión de derechos de invención y de patente de invención que se nos haga por cualquier persona, abonar todos los impuestos cuotas y pagos determinados por la ley, recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos, desistir, y tomar en fin todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses y en caso de presentarse oposiciones para que intervengan como demandantes o como demandados, con todas las demás facultades legales necesarias. Este poder comprende además las facultades de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extra-judiciales

Dado y firmado en (4)
Ciudad de Mahwah, País de Bergen
Estado de New Jersey, Estados Unidos de América

Firma/Signature By:

Name: Sean E. Ryder, Esq.
Title: Director of Intellectual Property

Corporate Seal to be Affixed

Director de Propiedad Intelectual

POWER OF ATTORNEY

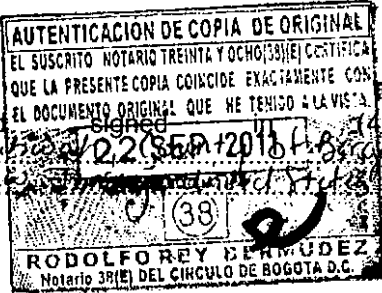
(1) GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

domiciled in (2) Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-De-Fonds-Switzerland

hereby appoint Dr. Germán Castillo Grau and/or Adriana Castillo-Gibsone and/or Luis Felipe Castillo-Gibsone

with offices at Carrera 13 No. 37-43, 12th Floor in Bogotá, Colombia as our representatives with special ample and sufficient power to obtain from the offices and Colombian authorities, administrative, judicial and police, in first or in second instance, Patents of Invention, registration of Trade or Service Marks, Industrial Designs, of Commercial Names and Ensigns, as well as assignments, extensions, renewals, changes of names and addresses, registration of licences of exploitation and licences of use referring to said actions who are empowered to take before said authorities all of the necessary steps for the purposes indicated, to file applications, to formulate descriptions, corrections, protests, declarations, appeals and claims, apply for precautionary measures, to accept on our behalf and representation the assignment of rights on invention and titles of invention that may be given to us by any person, to pay all taxes, quotas and payments prescribed by law, to receive all the documents and proceeds giving the respective acquiescence or receipt, to fulfill any other requisites to desist and take in fact any other measures that may be deemed conducive to the safeguard of our interests, and in case oppositions are presented to intervene as plaintiff or defendant, with all necessary legal faculties. This power includes the faculties to receive, desist, compromise, transact, substitute it in all or in part, to revoke substitutions, to receive notifications and to appoint judicial or extra-judicial attorneys.

Given and signed
City of Mahwah, State of New Jersey, United States of America



glenmark PHARMACEUTICALS S.A.
Chemin de la Combeta 5
CH-2300 La Chaux-de-Fonds
+41 (0)32 729 3550 - +41 (0)32 729 3560

STATE OF NEW JERSEY,
COUNTY OF BERGEN) SS.:

I, Kathleen A. Donovan, Clerk of the County of Bergen
(the same being an office of Record of the aforesaid County,
having by law a seal)

DO HEREBY CERTIFY, That, Jennifer E. Byrne,
whose name is subscribed to the attached certificate of acknowledgement, proof or affidavit, was at the time of taking said
acknowledgement, proof or affidavit, a NOTARY PUBLIC, duly commissioned and sworn and residing in said State, and was, as such
NOTARY PUBLIC, an officer of said State duly authorized by the laws thereof to take and certify the same, as well as to take and certify
the proof and acknowledgement of deeds for the conveyance of land, tenements or hereditaments, and other instruments in writing to be
recorded in said State, and that the said acknowledgement is duly executed and taken according to the laws of said State, and that I am
well acquainted with his/her handwriting and verily believe the signature to the attached certificate is his/her genuine signature.

And I do further certify that the impression of the seal of such NOTARY PUBLIC is not required by the laws of this State to be
filed in my office.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my official seal this

27th day of June A.D., 20 07
Kathleen A. Donovan



DECLARACION NOTARIAL

(Individual)

A los 19 días del mes de Junio de 2007
compareció personalmente ante mí, Notario
Público el/la señor(a) Sean E. Ryder, Esq.

A quien(es) doy fé de conocer y me consta que
es(son) la(s) persona(s) descrita(s) y firmante(s)
del documento que precede, declarando ante mí
que otorga(n) el mismo para los fines y
propósitos que en él se expresan.

El Notario Público

(Sociedades)

El infrascrito Notario certifica: que la firma que
antecede y dice

SEAN E. RYDER, ESQ.
es auténtica; que el signatario desempeña el

cargo de

Director de Propiedad Intelectual

de **GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.**

que tiene facultad para otorgar este poder;

y que dicha compañía está domiciliada en

Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-
De-Fonds, Suiza

y actualmente existe y está organizada de

acuerdo a las leyes de Suiza

Todos los hechos anteriores le constan por

haber examinado los documentos respectivos y

de todo ello da fe..

Dado y firmado en Ciudad de Mahwah,
País de Bergen, Estado de New Jersey,
Estados Unidos de América

El Notario Público

(Con Apostilla)

**NOTARIAL CERTIFICATE**

(Individuals)

On this 19th day of June of 2007.....
personally appeared before me, a Notary Public,
Sean E. Ryder, Esq......

to me known, and known to me be the person(s)
described in and who executed the foregoing
document, and he(they) duly acknowledged to
me that he(they) executed same for the uses
and purposes therein expressed.

Notary Public

(Corporations)

The undersigned Notary Public certifies: that

The preceeding signature reading

Sean E. Ryder, Esq.
is authentic; that the signor at present fills the

post of

Director of Intellectual Property
of **GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.**

and that he/she is empowered to grant this power;

and that said company is domiciled in

Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-
De-Fonds, Switzerland

and actually exists and is organized in

accordance with the laws of Switzerland

All the foregoing facts are known to the Notary

due to his/her having examined the respective

documents to which he/she, the Notary, attests.

Granted and signed in City of Mahwah,
County of Bergen, State of New Jersey,
United States of America.

Notary Public

(With Apostille)

JENNIFER E. BYRNE**Notary Public of New Jersey****My Commission Expires July 7, 2009**

ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE SE UNEN A CD19 Y SUS USOS

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que se unen al CD19 humano. Más específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 de humano, que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del
10 SEQ ID NO: 27, o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29; o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, o una CDR2 de cadena ligera que
15 comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Generalmente se han sugerido los marcadores de superficie de las células B como blancos para el tratamiento de trastornos o enfermedades de células B, enfermedad autoinmune y rechazo de trasplante. Los ejemplos de los marcadores de superficie de células B incluyen los marcadores de
25 superficie de leucocito CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 y CD86. Se han desarrollado anticuerpos que se unen específicamente a algunos de estos marcadores, y algunos se han probado

para el tratamiento de enfermedades y trastornos.

Por ejemplo, se ha mostrado que las terapias basadas en anticuerpo monoclonal (mAb) quimérico o radiomarcado dirigidas contra la molécula de superficie celular CD20 específica para células B maduras y sus contrapartes malignas, son un tratamiento eficaz *in vivo* para el linfoma no Hodgkin (Tedder *et al*, *Immunol. Today* 15:450-454 (1994); Press *et al*, *Hematology*, 221-240 (2001); Kaminski *et al*, *N. Engl. J. Med.*, 329:459-465 (1993); Weiner, *Semin. Oncol*, 26:43-51 (1999); Onrust *et al*, *Drugs*, 58:79-88 (1999); McLaughlin *et al*, *Oncology*, 12:1763-1769 (1998); Reff *et al*, *Blood*, 83:435-445 (1994); Maloney *et al*, *Blood*, 90:2188-2195 (1997); Maloney *et al*, *J. Clin. Oncol*, 15:3266-3274 (1997); Anderson *et al*, *Biochem. Soc. Transac*, 25:705-708 (1997)). También se ha encontrado que la terapia con anticuerpo monoclonal anti-CD20 mejora las manifestaciones de la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, púrpura trombocitopénico idiopático y anemia hemolítica, así como también otras enfermedades mediadas por inmunidad (Silverman *et al*, *Arthritis Rheum.*, 48:1484-1492 (2002); Edwards *et al*, *Rheumatology*, 40:1-7 (2001); De Vita *et al*, *Arthritis Rheumatism*, 46:2029-2033 (2002); Leandro *et al*, *Ann. Rheum. Dis.*, 61: 883-888 (2002); Leandro *et al*, *Arthritis Rheum.*, 46:2673-2677 (2001)). Se mostró que el anticuerpo monoclonal anti-CD22 LL-2 es eficaz en el tratamiento de pacientes de linfoma agresivo y recurrente sometidos a tratamiento quimioterapéutico (Goldenberg, patentes de EE. UU. Nos: 6,134,982 y 6,306,393). El anticuerpo anti-CD20 (IgG1), RITUXA (TM), se ha usado exitosamente en el tratamiento de algunas enfermedades tales como púrpura trombocitopénico inmune del adulto, artritis reumatoide y anemia hemolítica autoinmune (Cured *et al*, WO 00/67796). A pesar de la eficacia de esta terapia, la mayoría de las leucemias linfoblásticas agudas (ALL) y muchas otras malignidades de células B no expresan CD20, o expresan CD20 en bajas cantidades, o han perdido la

P

expresión de CD20 después de la inmunoterapia de CD20 (Smith *et al* ,
Oncogene, 22:7359-7368 (2003)). Además, la expresión de CD20 no es
profética de la respuesta a la terapia anti-CD20 ya que solo la mitad de los
pacientes de linfoma no Hodgkin responden a la inmunoterapia dirigida a
5 CD20.

La molécula del CD19 humano es un receptor de superficie
celular estructuralmente distinto expresado sobre la superficie de las células B
humanas, que incluyen sin limitación los precursores de células B, células B
en desarrollo temprano (esto es, células B inmaduras), células B maduras
10 mediante diferenciación terminal en células de plasma, y células B malignas.
El CD19 es expresado por la mayoría de las leucemias linfoblásticas agudas
(ALL) de precursores de células B, linfomas no Hodgkin, leucemias linfocíticas
crónicas de células B (CLL), leucemias prolinfocíticas, leucemias de células
pilosas, leucemias linfocíticas agudas comunes, y algunas leucemias
15 linfoblásticas agudas Null (Nadler *et al*, *J. Immunol.*, 131:244-250 (1983),
Loken *et al*, *Blood*, 70:1316-1324 (1987), Uckun *et al*, *Blood*, 71:13- 29 (1988),
Anderson *et al*, 1984. *Blood*, 63:1424-1433 (1984), Scheuermann, *Leuk.*
Lymphoma, 18:385-397(1995)). La expresión de CD19 en las células del
plasma sugiere además que el CD19 puede ser expresado en tumores de
20 células B diferenciadas, tales como mieloma múltiple, plasmacitomas, tumores
de Waldenstrom (Grossbard *et al.*, *Br. J. Haematol*, 102:509- 15(1998); Treon
et al, *Semin. Oncol*, 30:248-52(2003)).

El antígeno CD19 también ha sido uno de los muchos blancos
propuestos para inmunoterapia. Se mostró que el anticuerpo CLB-CD19
25 (mAb IgG2a murino anti-CD19) inhibe el crecimiento de tumores humanos
implantados en ratones atímicos (Hooijberg *et al*, *Cancer Research*, 55:840-
846 (1995)). En otro estudio, el anticuerpo monoclonal murino FMC63
(IgG2a) se construyó en quimera usando una región Fc de IgG1 humana (Zola

et al, Immunol Cell Biol 69:411-22 (1991)). Este anticuerpo no induce citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC *in vitro*, y su administración a ratones SCID que llevan un linfoma de células B humanas (modelo de xenotransplante) resultó en una destrucción moderada pero
 5 inespecífica de las células de tumor transplantadas (Pietersz *et al, Cancer Immunol. Immunother.*, 41:53-60 (1995)).

Los resultados obtenidos usando modelos de ratón de xenotransplante de implante de tumor conllevaron a estudios con anticuerpos anti-CD19 murinos en pacientes humanos. El anticuerpo CLB-CD19 se
 10 administró a seis pacientes a quienes se les había diagnosticado linfoma no Hodgkin progresivo que no habían respondido a la terapia convencional previa (quimioterapia o radioterapia). A estos pacientes se le administraron dosis totales de anticuerpo de 225 mg a 1000 mg (Hekman *et al., Cancer Immunol. Immunotherapy*, 32:364-372 (1991)). Aunque las células tumorales
 15 circulantes se redujeron temporalmente en dos pacientes después de la infusión del anticuerpo, solamente en un paciente se logró una remisión parcial después de dos periodos de tratamiento con el anticuerpo. No se pudieron hacer conclusiones con respecto a la eficacia terapéutica de este grupo pequeño de pacientes refractarios.

20 Subsiguientemente, estos investigadores mostraron en modelos de transplante que los efectos antitumorales de mAb de CD20 no conjugados son muy superiores a los de mAb de CD19 (Hooijberg *et al, Cancer Res.*, 55:840-846 (1995); y Hooijberg *et al, Cancer Res.*, 55:2627-2634 (1995)). Además, no se observaron efectos aditivos o sinérgicos sobre la incidencia del
 25 tumor cuando usaron en combinación mAb de CD19 y CD20 (Hooijberg *et al, Cancer Res.*, 55:840- 846 (1995)). Aunque se reconoció que los modelos de xenotransplante de animal son malos indicadores pronósticos de la eficacia en sujetos humanos, los resultados negativos logrados en estos estudios de

animal desalentaron el interés en la terapia con anticuerpos anti-CD19 simples.

El uso de inmunotoxinas basadas en un anticuerpo anti-CD19 produjo resultados igualmente desalentadores. En pruebas clínicas iniciales, el anticuerpo anti-CD19 B4 (mAb de IgG1 murina) se conjugó con la toxina de planta ricina y se le administró a pacientes humanos que tenían mieloma múltiple que no habían respondido a la terapia convencional previa (Grossbard *et al.*, *British Journal of Haematology*, 102:509-515(1998)), linfoma no Hodgkin avanzado (Grossbard *et al.*, *Clinical Cancer Research*, 5:2392-2398 (1999)), y malignidades de células B refractarias (Grossbard *et al.*, *Blood*, 79:576-585 (1992)). Estas pruebas demostraron en general la seguridad de la administración del conjugado de B4-ricina a los humanos; sin embargo, los resultados fueron mixtos y las tasas de respuesta fueron desalentadoras en comparación con las pruebas clínicas con RITUXAN^(TM) (Grossbard *et al.*, *Clinical Cancer Research*, 5:2392-2398 (1999)). Además, una parte significativa de los pacientes desarrollaron una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) o una respuesta de anticuerpo humano anti-ricina (HARA).

Dado el hecho de que las terapias actuales que usan anticuerpos anti-CD19 simples o inmunotoxinas basadas en anticuerpo anti-CD19 producen resultados igualmente desalentadores, existe la necesidad de desarrollar anticuerpos anti-CD19 que sean más eficaces para tratar los trastornos mediados por CD19, por ejemplo anticuerpos anti-CD19 que sean capaces de inducir eficientemente la muerte de células tumorales activando la apoptosis y el bloqueo de la proliferación de células B, y mediando la destrucción por medio de ADCC.

M

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En términos generales, la presente revelación se refiere a anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que se unen al CD19 humano, métodos para su preparación y uso, incluso métodos para el tratamiento de trastornos mediados por CD19. Los anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que se unen al CD19 humano de la presente invención muestran muchas propiedades deseables que incluyen por ejemplo actividad de ADCC, inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación de células B.

En un aspecto, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29. En otro aspecto, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.

En otro aspecto, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, o una CDR3 de

14

cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29; o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, o una CDR3
5 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada
10 seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22 y 42.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una región variable de armazón de cadena pesada que es el producto o deriva de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en
15 V3-33*01 (SEQ ID NO: 11), V3-11*01 (SEQ ID NO: 12), V3-30*-18 (SEQ ID NO: 13) y V3-48*01 (SEQ ID NO: 14).

En un aspecto adicional, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera
20 seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26 y 41.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una región variable de armazón de cadena ligera que es el producto o deriva de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en
25 V1-5*03 (SEQ ID NO: 3), V1-27*01 (SEQ ID NO: 4), V1-39*-01 (SEQ ID NO: 5) y V1-12*01 (SEQ ID NO: 6).

En un aspecto adicional, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que se une al CD19



humano, que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 y 55.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un
5 anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 y 63.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un
10 anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende:

- a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 64; y
- b) una secuencia de cadena ligera que comprende la
15 secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende:

- a) una secuencia de cadena pesada que comprende
20 la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 66; y
- b) una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 67.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que se une al CD19
25 humano, que comprende:

- a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 66; y
- b) una secuencia de cadena ligera que comprende la

1/6

secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

En un aspecto adicional, la presente invención provee anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que se unen a CD19 humano, que comprenden regiones constantes pesadas o ligeras humanas, en donde la región constante pesada humana comprende una variante isotípica que comprende la CH1 de IgG1 humana, el gozne de IgG1 humana y la región Fc de IgG3 humana.

En un aspecto adicional, la presente invención provee anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que se unen a CD19 humano, que comprenden una región Fc variante de IgG humana que comprende por lo menos una modificación de aminoácido con respecto a la región Fc de IgG humana del anticuerpo progenitor, en donde el anticuerpo que comprende la región FC variante de IgG humana presenta una función efectora alterada en comparación con el anticuerpo progenitor.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que se une al CD19 humano, en donde el anticuerpo comprende una región Fc variante de IgG humana que comprende la sustitución de aminoácido S324N, que reemplaza la serina en la posición de aminoácido 324 del anticuerpo progenitor con asparagina, en donde el anticuerpo que comprende la región de Fc variante de IgG humana presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mejorada en comparación con un anticuerpo progenitor.

En un aspecto adicional, la presente invención provee anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que se unen al CD19 humano, que tienen varias propiedades deseables tales como su unión a células de tumor de Raji, unión a CD19 humano con una afinidad (K_d) de 50nM o menor, retención de por lo menos 20% de la afinidad de unión de CD19 (K_d) del anticuerpo quimérico correspondiente, competencia por la unión

17

con células de tumor de Raji con una afinidad (K_i) de 50 nM o menor, inducción de apoptosis de células de tumor de Raji, actividad de ADCC en células de tumor de Raji, inhibición de la proliferación de células B malignas, inhibición de la clonogenicidad de células de tumor de Raji, agotamiento de
5 células B de la sangre, internamiento en células de tumor de Raji, y una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor de 65°C.

La presente revelación también provee ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos que se unen al CD19 humano; vectores y células hospederas que comprenden el
10 ácido nucleico o el vector. También se proveen composiciones que comprenden el anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable; e inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo enlazado con un agente terapéutico.

15 La presente revelación también provee métodos para tratar trastornos mediados por CD19, métodos para inhibir el crecimiento de células de tumor que expresan CD19, y métodos para agotar las células B de un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

La presente revelación también provee kits y artículos de
20 fabricación que comprenden el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, la composición o el inmunoconjugado, para el tratamiento de un trastorno mediado por CD19.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25

Las figuras 1A y 1B muestran el análisis de citometría de flujo para determinar la actividad de unión de CDR de FMC63 injertadas en armazones de anticuerpo aceptor humano en células de tumor de Raji.

16

Las figuras 2A y 2B muestran la alineación de la región variable de cadena ligera (figura 2A) o cadena pesada (figura 2B) de FMC63 con armazones de línea germinal seleccionados de armazones amplificados con donador de VBASE2 e injertados con CDR. Se usa la numeración de Kabat y se muestra abajo de la fila de numeración.

La figura 3 muestra la actividad de unión de anticuerpos humanizados sobre células de linfoma de células B humanas SU-DHL-6, determinada por citometría de flujo.

Las figuras 4A y 4B muestran curvas de análisis de Scatchard de anticuerpos anti-CD19 humanizados. El análisis se hizo sobre células de tumor de Raji usando anticuerpos marcados con europio.

Las figuras 5A y 5B muestran la actividad de ADCC de anticuerpos anti-CD19 humanizados sobre células de tumor de Raji.

La figura 6 muestra la inducción de apoptosis por anticuerpos anti-CD19 humanizados sobre células de tumor de Raji.

La figura 7A muestra la inhibición de la proliferación de células de linfoma de células B humanas SU-DHL-6 causada por los anticuerpos anti-CD19 humanizados. La figura 7B muestra la clonogenicidad de las células de tumor de Raji después del tratamiento con anticuerpos anti-CD19 humanizados.

La figura 8 muestra el internamiento de anticuerpos anti-CD19 en células de tumor de Raji. El internamiento se monitorea por medio de la citotoxicidad de un anticuerpo secundario conjugado con saporina (Hum-ZAP).

La figura 9 muestra la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de mutantes de anticuerpo anti-CD19 en la posición S324, en comparación con VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A de tipo silvestre: (1) anticuerpo de control IgG1; (2) VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (3) VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (4)

VH16 R94K/S324G-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) VH16 R94K/S324A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (6) VH16 R94K/S324V-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (7) VH16 R94K/S324L-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (8) VH16 R94K/S324I-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (9) VH16 R94K/S324P-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (10) 5 VH16 R94K/S324T-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (11) VH16 R94K/S324C-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (12) VH16 R94K/S324M-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (13) VH16 R94K/S324Q-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (14) VH16 R94K/S324F-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (15) VH16 R94K/S324Y-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (16) VH16 R94K/S324W-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; 10 (17) VH16 R94K/S324R-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (18) VH16 R94K/S324D - VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (19) suero solo.

La figura 10 muestra la prueba de CDC de variantes de anticuerpo anti-CD19 con sustitución en las posiciones E269, S298 y S324: (1) control negativo -sin anticuerpo; (2) anticuerpo de control IgG1; (3) VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (4) VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) VH16 R94K/S298A/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (6) VH16 R94K/E269D/S298A/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A. 15

La figura 11 muestra la prueba de ADCC basada en célula de variantes seleccionadas del anticuerpo anti-CD19: (1) control negativo -sin anticuerpo; (2) anticuerpo de control IgG1; (3) VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (4) VH16 R94K/S298A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) VH16 R94K/E269D/S298A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A. 20

La figura 12 muestra una prueba de CDC basada en célula de variantes seleccionadas del anticuerpo anti-CD19: (1) anticuerpo de control IgG1; (2) VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (3) VH16 R94K (1133)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (4) VH16 R94K/K274Q-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) VH16 R94K/N276K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (6) VH16 R94K/K334R-VL43 25

V3Q/T7S/P44I/N92A; (7) VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (8) VH16 R94K/K274Q/N276K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (9) VH16 R94K/K274Q/N276K/K334R-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (10) control negativo -sin anticuerpo -sin suero; (11) control negativo -solo suero.

5 La figura 13 muestra la prueba de ADCC basada en célula de variantes defucosiladas del anticuerpo anti-CD19: (1) control negativo -sin anticuerpo; (2) anticuerpo de control IgG1; (3) VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (4) VH16 R94K (ARNph)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) VH16 R94K (GNTIII)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (6) VH16 R94K/E269D/S298A (ARNph)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (7) VH16 R94K/E269D/S298A (GNTIII)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A.

La figura 14 muestra el agotamiento de células B (ACN del total de células B) causado por variantes de anticuerpo anti-CD19, detectado en los bazo de ratones SCID: (1) control negativo -sin PBMC humanas; (2) PBMC humanas -Herceptin®; (3) PBMC humanas -Mabthera®; (4) PBMC humanas- VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) PBMC humanas- VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A.

La figura 15 muestra el agotamiento de células B (porcentaje del total de células B) causado por variantes del anticuerpo anti-CD19, detectado en los bazo de ratones SCID: (1) control negativo -sin PBMC humanas; (2) PBMC humanas- Herceptin®; (3) PBMC humanas- Mabthera®; (4) PBMC humanas- VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A; (5) PBMC humanas- VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente revelación se refiere a anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos que se unen al CD19 humano.

El término "CD19 humano", como se usa aquí, incluye variantes, isoformas y especies homólogas del CD19 de humano. Por consiguiente, los anticuerpos humanizados de esta revelación, en algunos casos, pueden reaccionar cruzadamente con CD19 de especies diferentes del humano. En algunas modalidades, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para una o más proteínas CD19 humanas y pueden no exhibir reactividad cruzada entre especies u otros tipos no humanos. La secuencia de aminoácidos completa de un CD19 humano ejemplar tiene el No. de registro SwissProt P 15391 (SEQ ID NO: 125). El CD19 se conoce también como antígeno B4 de superficie de células B, antígeno CD19 de células B, antígeno CD19, y Leu-12. El CD19 humano es denominado GenelD: 930 por Entrez Gene, y HGNC: 1633 por HGNC. El CD19 puede ser codificado por el gen denominado CD19. El uso de "CD19 humano" abarca en la presente todos los alelos conocidos y aún no descubiertos y las formas polimórficas del CD19 humano. El término "CD19", como se usa aquí, se refiere al "CD19 humano" si no se indica específicamente de otra manera.

El término "anticuerpo que se une al CD19 humano", como se usa aquí, incluye anticuerpos, preferiblemente anticuerpos de IgG, que se unen al CD19 humano, por ejemplo CD19 humano expresado sobre la superficie de células de tumor de Raji, como las células de tumor de Raji DSMZ ACC319, con una afinidad (K_d) de 500 nM o menor, de preferencia 100 nM o menor, muy de preferencia 50 nM o menor.

Por "células B" o "linfocitos B", como se usa aquí, se entiende un tipo de linfocito desarrollado en la médula ósea que circula en la sangre y la linfa y provee inmunidad humoral. Las células B reconocen moléculas de antígeno libres y se diferencian o maduran en células plasmáticas que secretan inmunoglobulina (anticuerpos) que desactivan los antígenos. También se generan células de memoria que hacen a la inmunoglobulina

(anticuerpos) especifica por encuentros subsiguientes con dicho antígeno. Las células B también se conocen como "células *beta*" en la isleta de Langerhans.

El término "anticuerpo", como se usa aquí, incluye anticuerpos
5 completos y cualquier fragmento de unión de antígeno o cadenas sencillas del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o un fragmento de unión de antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena
10 pesada (abreviada aquí como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un
15 dominio, CL. Además, las regiones VH y VL se pueden subdividir más en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de armazón (FR o FW). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al
20 extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina con tejidos o factores del hospedero, incluso varias células del sistema inmune (por ejemplo
25 células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

El término "anticuerpo quimérico", como se usa aquí, incluye anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una

especie y las secuencias de la región constante se derivan de otras especies, tales como un anticuerpo en el que las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

5 El término "anticuerpo humanizado", como se usa aquí, incluye anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, sobre secuencias de armazón de humano. Se pueden hacer modificaciones adicionales de la región de armazón dentro de las secuencias de armazón
10 humanas y también dentro de las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero.

El término "anticuerpo humano", como se usa aquí, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones de armazón como las regiones CDR se derivan de secuencias de
15 inmunoglobulina humana de línea germinal. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina humana de línea germinal. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina humana de línea germinal (por
20 ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro*, o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, como se usa aquí, el término "anticuerpo humano", no incluye anticuerpos en los que se han insertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como ratón, sobre secuencias de armazón
25 humanas.

Como se usa aquí, un anticuerpo humanizado comprende regiones variables de armazón de cadena pesada o ligera que son "el producto de" o "derivan de" una secuencia de línea germinal humana

particular (gen humano) si las regiones de armazón variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes humanos de inmunoglobulina de línea germinal. Tales sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico, que lleva genes humanos de inmunoglobulina, con el antígeno de interés, o el examen de una colección de genes humanos de inmunoglobulina desplegados sobre un fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de armazón de cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina humana de línea germinal puede ser identificado, por ejemplo, comparando la secuencia de aminoácidos de la región variable de armazón de cadena pesada o ligera del anticuerpo humanizado con las secuencias de aminoácidos de la región variable de armazón de cadena pesada o ligera de inmunoglobulinas humanas de línea germinal. Un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de armazón de cadena pesada o ligera que es "el producto de" una secuencia particular de inmunoglobulina humana de línea germinal, tiene una región variable de armazón de cadena pesada o ligera que es 100% idéntica en su secuencia de aminoácidos con la región variable de armazón de cadena pesada o ligera de la secuencia particular de inmunoglobulina humana de línea germinal. Un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de armazón de cadena pesada o ligera que "deriva de" una secuencia particular de inmunoglobulina humana de línea germinal, puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la región variable de armazón de cadena pesada o ligera de la secuencia particular de línea germinal, debido por ejemplo a mutaciones somáticas naturales o a la introducción intencional de mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humanizado seleccionado normalmente es por lo menos 90% idéntico en su secuencia de aminoácidos de la región variable de armazón de cadena pesada o ligera, a

23

una secuencia de aminoácidos codificada por la región variable de armazón de cadena pesada o ligera de un gen humano de inmunoglobulina de línea germinal, y contiene residuos de aminoácido que identifican el anticuerpo humanizado como derivado de humano cuando se compara con las

5 secuencias de aminoácido de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murinas). En algunos casos un anticuerpo humanizado puede ser preferiblemente por lo menos 95% idéntico, de preferencia por lo menos 96%, de preferencia por lo menos 97%, en particular por lo menos 98%, más en particular por lo menos 99%

10 idéntico en su secuencia de aminoácidos de la región variable de armazón de cadena pesada o ligera, a la secuencia de aminoácidos de la región variable de armazón de cadena pesada o ligera codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Normalmente la región variable de armazón de cadena pesada o ligera de un anticuerpo humanizado derivado de

15 una secuencia particular de línea germinal humana, presentará no más de 10 diferencias de aminoácidos, de preferencia no más de 5, o muy de preferencia no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de la secuencia de aminoácidos de la región variable de armazón de cadena pesada o ligera codificada por el gen humano de inmunoglobulina de línea germinal.

20 El término "Fab" o " región Fab", como se usa aquí, incluye los polipéptidos que comprenden los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL. El Fab se puede referir a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo.

El término "Fc" o "región Fc", como se usa aquí, incluye el

25 polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Así, este Fc se refiere a los últimos dos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD e IgG, y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de la región

28

constante de IgE e IgM, y el gozne flexible N-terminal para estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede influir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina *Cgamma2* y *Cgamma3* (*C[gamma]2* y *C[gamma]3*) y el gozne entre *Cgamma1* (*C[gamma]1*) y *Cgamma2* (*C[gamma]2*). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana usualmente se define comprendiendo los residuos C226 o P230 en su extremo carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Para la IgG1 humana, la región Fc se define en la presente comprendiendo el residuo P232 en su extremo carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Fc se puede referir a esta región en aislamiento o a esta región en el contexto de un polipéptido de Fc, por ejemplo un anticuerpo.

El término "gozne" o "región de gozne" o "región de gozne de anticuerpo" incluye aquí el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominio constante de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG empieza en la posición del residuo EU 237. Así, para la IgG, se define aquí que el gozne de anticuerpo incluye las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 231 (A231 en IgG1), en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat.

El término "anticuerpo progenitor" o "inmunoglobulina progenitora", como se usa aquí, incluye un anticuerpo no modificado que subsiguientemente se modifica para generar una variante. Dicho anticuerpo progenitor puede ser un anticuerpo natural, o una variante o versión construida por ingeniería de un anticuerpo natural. El anticuerpo progenitor se puede referir al anticuerpo mismo, composiciones que comprenden el anticuerpo progenitor, o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Como se usa aquí, se entiende que "anticuerpo anti-CD19 progenitor" es un

anticuerpo o inmunoglobulina que se une al CD19 humano y se modifica para generar una variante.

El término "anticuerpo progenitor" o "inmunoglobulina progenitora", como se usa aquí, incluye un anticuerpo murino o quimérico que
5 subsiguientemente se modifica para generar un anticuerpo humanizado.

El término "anticuerpo variante" o "variante de anticuerpo", como se usa aquí, incluye una secuencia de anticuerpo que difiere de una secuencia de anticuerpo progenitor en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido en comparación con el progenitor.
10 Preferiblemente, la secuencia de anticuerpo variante de la presente tendrá por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, de preferencia por lo menos aproximadamente 90%, muy de preferencia por lo menos aproximadamente 95% con una secuencia de anticuerpo progenitor. La variante de anticuerpo se puede referir al anticuerpo mismo, a
15 composiciones que comprenden la variante de anticuerpo, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica.

El término "modificación de aminoácido", como se usa aquí, incluye una sustitución, inserción o supresión de aminoácido en una secuencia de polipéptido. Por "sustitución de aminoácido" o "sustitución" se
20 entiende aquí el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido progenitor, con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución R94K se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de la región variable de armazón de cadena pesada, en donde la arginina en la posición 94 está remplazada con una lisina. Para el ejemplo
25 precedente, 94K indica la sustitución de la posición 94 con una lisina. Para los fines de la presente, las sustituciones múltiples normalmente se separan con una diagonal. Por ejemplo, R94K/L78V se refiere a una variante doble que comprende las sustituciones R94K y L78V. Por "inserción de aminoácido"

26

o "inserción", como se usa aquí, se entiende la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido progenitor. Por ejemplo, el inserto 94 designa una inserción en la posición 94. Por "supresión de aminoácido" o "supresión", como se usa aquí, se entiende la remoción de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido progenitor. Por ejemplo, R94 designa la supresión de arginina en la posición 94.

Como se usa aquí, el término "modificaciones conservativas" o "modificaciones de secuencia conservativas" se refiere a modificaciones de aminoácido que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, inserciones y supresiones de aminoácido. Las modificaciones se pueden introducir en un anticuerpo de la invención mediante las técnicas estándares conocidas, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.

Las sustituciones conservativas de aminoácido son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en este campo familias de residuos de aminoácido que tiene cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, uno o más residuos de aminoácido dentro de las regiones CDR o dentro de las regiones de armazón



de un anticuerpo de la invención se pueden reemplazar con otros residuos de aminoácido de la misma familia de cadena lateral, y el anticuerpo alterado (anticuerpo variante) se puede probar para verificar la retención de su función.

Para todas las posiciones de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina expuestas en la presente invención, la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat (Kabat *et al.*, 1991, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, que se incorpora aquí en su totalidad como referencia). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo de IgG1 humana EU que se describe en Edelman *et al.*, 1969, *Biochemistry* 63:78-85.

El término "anticuerpo de longitud completa", como se usa aquí, incluye la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, que incluye regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos incluso humanos y ratones, el anticuerpo de longitud completa de la clase IgG es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, cada par teniendo una cadena ligera y una cadena pesada, cada cadena ligera comprendiendo los dominios de inmunoglobulina VL y CL, y cada cadena pesada comprendiendo los dominios de inmunoglobulina VH, CH1 (C[*gamma*]1), CH2 (C[*gamma*]2) y CH3 (C[*gamma*]3). En algunos mamíferos, por ejemplo en los camellos y las llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, cada cadena pesada comprendiendo un dominio variable unido a la región Fc.

Los fragmentos de anticuerpo incluyen, sin limitación, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, incluso Fab' y Fab'-SH, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward *et al.*, 1989, *Nature* 341: 544-546) que consiste en

a
m

una sola variable, (v) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados, (vi) moléculas Fv de una sola cadena (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están enlazados por un péptido enlazador que permite que los dos dominios se asocien para
5 formar un sitio de unión de antígeno (Brid *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426, Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883), (vii) dímeros de Fv biespecíficos de una sola cadena (PCT/US92/09965), (viii) "dianticuerpos" o "trianticuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión de genes (Tomlinson *et al.*, 2000, *Methods Enzymol.*
10 326:461-479; WO94/13804; Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448), y (ix) scFv fusionado genéticamente al mismo anticuerpo o a un anticuerpo diferente (Coloma y Morrison, 1997, *Nature Biotechnology* 15, 159-163).

Los anticuerpos se agrupan en clases también denominadas
15 isotipos, determinados genéticamente por la región constante. Las cadenas ligeras constantes humanas se clasifican como cadenas ligeras *kappa* (CK) y *lambda* (C[*lambda*]). Las cadenas pesadas se clasifican como *mu*, *delta*, *gamma*, *alfa*, o *épsilon*, y definen el isotipo de anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La clase IgG es la usada más comúnmente para
20 fines terapéuticos. En los humanos esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En los ratones esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. La IgM tiene subclases que incluyen, sin limitación, IgM1 e IgM2. La IgA tiene varias subclases que incluyen, sin limitación, IgA1 e IgA2. Así, como se usa aquí, se entiende que "isotipo" es cualquiera de las
25 clases o subclases de inmunoglobulina definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos conocidos de inmunoglobulinas humanas son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE.

31

El término "ADCC" o "citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo", como se usa aquí, incluye la reacción mediada por célula en donde células citotóxicas no específicas que expresan Fc[*gamma*]R reconocen el anticuerpo unido sobre una célula objetivo y subsiguientemente ocasionan la lisis de la célula objetivo. En varios aspectos, una función efectora ADCC intensificada puede significar un incremento de la potencia o un incremento de la eficacia. Como se usa en el contexto experimental, por "potencia" se entiende la concentración de anticuerpo cuando se observa la CE₅₀ (la concentración que causa la mitad del efecto máximo) de un efecto terapéutico particular. Como se usa en el contexto experimental, por "eficacia" se entiende la máxima función efectora posible a niveles de saturación del anticuerpo.

El término "ADCP" o fagocitosis mediada por célula dependiente de anticuerpo, como se usa aquí, incluye la reacción mediada por célula en donde células citotóxicas no específicas que expresan Fc[*gamma*]R reconocen el anticuerpo unido sobre la célula objetivo y subsiguientemente ocasionan la fagocitosis de la célula objetivo.

El término "CDC" o "citotoxicidad dependiente del complemento", como se usa aquí, incluye la reacción en donde uno o más componentes de proteína del complemento reconocen el anticuerpo unido sobre una célula objetivo y subsiguientemente causan la lisis de la célula objetivo.

El término "función efectora", como se usa aquí, incluye un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por Fc[*gamma*]R, tales como ADCC y ADCP, y funciones efectoras mediadas por el complemento, tales como CDC.

Como se usa aquí, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluyen todos los

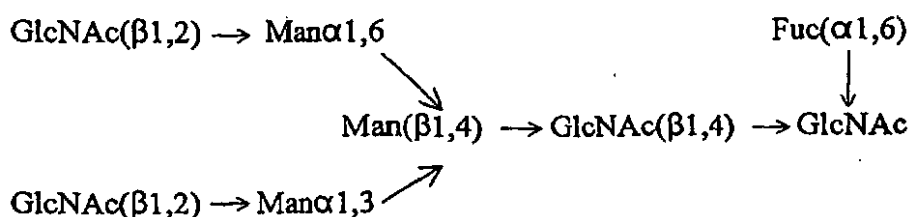
vertebrados, por ejemplo mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. Preferiblemente el sujeto es humano.

El término "variante isotípica", como se usa aquí, incluye una modificación de aminoácido que convierte por lo menos un aminoácido de un isotipo, preferiblemente por lo menos un aminoácido de la región constante de cadena pesada de un isotipo, en el aminoácido correspondiente de un isotipo alineado diferente. La modificación de aminoácido puede comprender la conversión de un dominio completo de la región constante de inmunoglobulina o, preferiblemente, de una región Fc de un isotipo en un isotipo diferente, por ejemplo la conversión de la región Fc de la región constante pesada de IgG1 humana en una región Fc de IgG3 humana, dando como resultado una variante isotípica que comprende la CH1 de IgG1 humana, el gozne de IgG1 humana y la región Fc de IgG3 humana.

El término "modificación isotípica", como se usa aquí, incluye una modificación de aminoácido que convierte un aminoácido de un isotipo en el aminoácido correspondiente de un isotipo alineado diferente. Por ejemplo, como IgG1 tiene una tirosina e IgG2 una fenilalanina en la posición de Kabat 296, una sustitución F296Y en IgG2 se considera una modificación isotípica.

El término "estructura central de carbohidrato madura", como se usa aquí, incluye una estructura central de carbohidrato procesada unida a una región Fc, que generalmente consiste en la estructura de carbohidrato GlcNAc (Fucosa)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)₂, típica de los oligosacáridos biantenarios representados esquemáticamente a continuación:

25



33

Este término incluye específicamente las formas G-1 de la estructura central de carbohidrato madura que carece de un residuo β 1,2-GlcNAc. Sin embargo, preferiblemente la estructura central de carbohidrato incluye ambos residuos β 1,2-GlcNAc. La estructura central de carbohidrato madura generalmente en la presente no está hipermanosilada. La estructura central de carbohidrato madura está unida a la región Fc de la glicoproteína, generalmente mediante un enlace N con Asn297 de un dominio CH2 de la región Fc.

10 Anticuerpos anti-CD19

En un primer aspecto, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, o una CDR2 de cadena pesada que
15 comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29. En otro aspecto, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ
20 ID NO: 30, o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En otro aspecto, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una CDR1 de
25 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29; o que

32x

comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 5 32.

Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29, o una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29; y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.

Es muy conocido que el dominio de CDR3 solo, independientemente de los dominios CDR1 o CDR2, puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo para un antígeno cognado, y que se pueden generar predeciblemente múltiples anticuerpos que tienen la misma

37

especificidad de unión basándose en una secuencia CDR3 común. Véase por ejemplo Klimka *et al*, *British J. of Cancer* 83 (2): 252-260 (2000) (que describe la producción de un anticuerpo anti-CD30 humanizado usando solo la CDR3 de dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD30 murino Ki-4);

5 Beiboer *et al*, *J. Mol. Biol.* 296: 833-849 (2000) (que describe anticuerpos recombinantes de glicoproteína epitelial 2 (EGP-2) usando solo la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo murino progenitor anti-EGP-2 MOC-31); Rader *et al*, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (que describe un panel de anticuerpos humanizados anti-integrina [*alfa*]*v*[*beta*]³

10 donde se usa un dominio de CDR3 variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo murino anti-integrina [*alfa*]*v*[*beta*]³ LM609, en donde cada anticuerpo miembro comprende una secuencia distinta fuera del dominio de CDR3 y es capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo murino progenitor, con afinidades tan altas como el anticuerpo murino progenitor o

15 aún más altas); Barbas *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (que describe que el dominio de CDR3 provee la contribución más significativa a la unión del antígeno).

Por consiguiente, la presente invención provee anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos que se unen al CD19 humano, que

20 comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada o ligera de un anticuerpo de un animal no humano, por ejemplo de un anticuerpo murino como FMC63, en particular que comprende la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29 o la CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:

25 32, en donde el anticuerpo es capaz de unirse a CD19. En algunas modalidades, estos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios de CDR3 de cadena pesada o ligera de un anticuerpo no humano, (a) son capaces de competir por la unión; (b) retienen las características

funcionales; (c) se unen al mismo epítoto; o (d) tienen una afinidad de unión similar, con respecto al anticuerpo no humano progenitor correspondiente, por ejemplo el anticuerpo murino.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22 y 42, preferiblemente una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 21, 22 y 42, de preferencia una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 21.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26 y 41, preferiblemente una secuencia de la región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 25 y 41, muy de preferencia una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 41.

En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22 y 42, y una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26 y 41, de preferencia una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 21, 22 y 42, y una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26 y 41, muy de preferencia una

37

secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 21, 22 y 42, y una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 25 y 41, de preferencia una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 21 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 41.

Dado que cada una de estas secuencias de región variable de cadena pesada y ligera se pueden unir al CD19 humano, las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden "mezclar y hacer coincidir" para crear las moléculas de unión anti-CD19 de la invención. La unión a CD19 de dichos anticuerpos "mixtos y hechos coincidir" se puede probar usando las pruebas de unión que se describen en los ejemplos.

En otro aspecto, la presente invención provee variantes de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se unen al CD19 humano. Así, la presente invención provee anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable de armazón de cadena pesada o ligera, que es por lo menos 80% idéntica (que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos) con la secuencia de aminoácidos de la región variable de armazón de cadena pesada o ligera del anticuerpo humanizado progenitor de cualquiera de la cadena pesada o ligera de, por ejemplo, cualquiera de la secuencia de región variable pesada y ligera de SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 41, respectivamente. Preferiblemente, la identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable de armazón de cadena pesada o ligera es de por lo menos 85%, de preferencia por lo menos 90%, de preferencia por lo menos 95%, en particular 96%, en particular 97%, más particularmente 98%, más en particular 99%, incluyendo por ejemplo 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

cf
y

99% y 100%. La identidad u homología con respecto a una secuencia de aminoácidos se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácido de la secuencia candidata que son idénticos al anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano, después de alinear las

5 secuencias e introducir huecos, si es necesario, para obtener el máximo del porcentaje de identidad. Así, la identidad de secuencia se puede determinar mediante los métodos estándares usados comúnmente para comparar la similitud de posiciones de los aminoácidos de los dos polipéptidos. Usando un programa de computadora, tal como BLAST o FASTA, se alinean dos

10 polipéptidos para igualación óptima de sus aminoácidos respectivos (a todo lo largo de una o las dos secuencias o a lo largo de una porción predeterminada de una o las dos secuencias). Los programas proveen una penalización de abertura por omisión y una penalización de hueco por omisión y, en conjunto con el programa de computadora, se puede usar una matriz de puntuación tal

15 como PAM250 (una matriz de puntuación estándar; véase Dayhoff *et al.*, en *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol 5, sup. 3 (1978)). Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede calcular de la siguiente manera: el número total de coincidencias idénticas multiplicado 100 y después dividido entre la suma de la longitud de la secuencia más larga del tramo coincidente y el

20 número de huecos introducidos en las secuencias más largas para alinear las dos secuencias.

En algunas modalidades la presente revelación provee así un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende una

25 secuencia de región variable de armazón de cadena pesada que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de la región de armazón de los SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22 o 42, o una secuencia de región variable de armazón de cadena ligera que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de la región de

a
m

armazón de los SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26 y 41.

En algunas modalidades, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende una

5 secuencia de región variable de armazón de cadena pesada que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de la región de armazón de los SEQ ID NOs: 21, 22 o 42, o una secuencia variable de región de armazón de cadena ligera que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de la región de armazón de los SEQ ID NOs: 25 o 41. En algunas modalidades, la presente

10 revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de armazón de cadena pesada que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de la región de armazón del SEQ ID NO: 21, o una secuencia de región variable de armazón

15 de cadena ligera que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de la región de armazón del SEQ ID NO: 41.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende las CDR de cadena pesada o ligera que se describen arriba y que

20 además comprende una región variable de armazón de cadena pesada que es el producto o deriva de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V3-33*01 (SEQ ID NO: 11), V3-11*01 (SEQ ID NO: 12), V3-30*-18 (SEQ ID NO: 13) y V3-48*01 (SEQ ID NO:14), preferiblemente una región variable de armazón de cadena pesada que es el producto o deriva del gen

25 humano V3-30*-18 (SEQ ID NO: 13) o V3-48*01 (SEQ ID NO: 14); preferiblemente, una región variable de armazón de cadena pesada que es el producto o deriva del gen humano V3-30*-18 (SEQ ID NO: 13). La región variable de armazón de cadena pesada puede comprender una o más

secuencias (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro) de región de armazón de cadena pesada (por ejemplo, armazón 1 (FW1), armazón 2 (FW2), armazón 3 (FW3), o armazón 4 (FW4)), presentes en el producto o derivados de esos genes humanos. Preferiblemente, el armazón de la región variable de cadena pesada comprende FW1, FW2 o FW3, preferiblemente FW1, FW2 y FW3 presentes en el producto o derivados de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V3-33*01 (SEQ ID NO: 11), V3-11*01 (SEQ ID NO: 12), V3-30*-18 (SEQ ID NO: 13) y V3-48*01 (SEQ ID NO: 14). Como se usa aquí, las secuencias de región de armazón de cadena pesada incluyen FW1 (posición 1 a posición 25), FW2 (posición 36 a posición 49), FW3 (posición 66 a posición 94) y FW4 (posición 103 a posición 113), en donde la posición de aminoácidos se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una región variable de armazón de cadena ligera que es el producto o deriva de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V1-5*03 (SEQ ID NO: 3), V1-27*01 (SEQ ID NO: 4), V1-39*-01 (SEQ ID NO: 5) y V1-12*01 (SEQ ID NO: 6), preferiblemente una región variable de armazón de cadena ligera que es el producto o deriva del gen humano V1-39*-01 (SEQ ID NO: 5). La región de armazón de la región variable de cadena ligera puede comprender una o más secuencias (por ejemplo una, dos, tres o cuatro) de región de armazón de cadena ligera (por ejemplo, armazón 1 (FW1), armazón 2 (FW2), armazón 3 (FW3) o armazón 4 (FW4)), presentes en el producto o derivado de esos genes humanos. Preferiblemente, el armazón de la región variable de cadena ligera comprende FW1, FW2 o FW3, de preferencia FW1, FW2 y FW3, presentes en el producto o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V1-5*03 (SEQ ID NO: 3), V1-27*01 (SEQ ID NO: 4), V1-39*-01 (SEQ ID NO: 5) y V1-12*01 (SEQ ID NO: 6). Las

5/1

secuencias de región de armazón de cadena ligera usadas en la presente incluyen FW1 (posición 1 a posición 23), FW2 (posición 35 a posición 49), FW3 (posición 57 a posición 88) y FW4 (posición 98 a posición 108), en donde la posición de aminoácido se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano comprende una región variable de armazón de cadena pesada que es el producto o deriva de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V3-33*01 (SEQ ID NO: 11), V3-11*01 (SEQ ID NO: 12), V3-30*-18 (SEQ ID NO: 13) y V3-48*01 (SEQ ID NO: 14), y una región variable de armazón de cadena ligera que es el producto o deriva de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V1-5*03 (SEQ ID NO: 3), V1-27*01 (SEQ ID NO: 4), V1-39*-01 (SEQ ID NO: 5) y V1-12*01 (SEQ ID NO: 6), preferiblemente una región variable de armazón de cadena pesada que es el producto o deriva de un gen humano V3-30*-18 (SEQ ID NO: 13) o V3-48*01 (SEQ ID NO: 14), y una región variable de armazón de cadena ligera que es el producto o deriva del gen humano V1-39*-01 (SEQ ID NO: 5), de preferencia una región variable de armazón de cadena pesada que es el producto o deriva del gen humano V3-30*-18 (SEQ ID NO: 13) y una región variable de armazón de cadena ligera que es el producto o deriva del gen humano V1-39*-01 (SEQ ID NO: 5).

La presente invención también abarca las combinaciones de las regiones de armazón de la región variable de cadena pesada que están presentes en el producto o derivan de genes humanos diferentes, o las regiones de armazón de la región variable de cadena ligera que están presentes en el producto o derivan de genes humanos diferentes; por ejemplo, FW1 y FW2 presentes en el producto o derivados de V3-30*-18 (SEQ ID NO: 13) combinados con FW3 presente en el producto o derivado de V3-48*01

(SEQ ID NO: 14), o FW1 y FW2 presentes en el producto o derivados de V1-39*-01 (SEQ ID NO: 5) combinados con FW3 presente en el producto o derivado de V1-12*01 (SEQ ID NO: 6).

Las secuencias de ADN de línea germinal para los genes humanos de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de línea germinal humana "VBase" (disponible en el Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como también en Kabat, E. A., *et al.* (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services; NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germline VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836. Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal de los genes humanos de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden encontrar en la base de datos Genbank.

En otro aspecto, la presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, en donde por lo menos una de las CDR de cadena pesada o por lo menos una de las CDR de cadena ligera comprenden por lo menos una modificación de aminoácido. Se puede hacer mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir las modificaciones, y el efecto sobre la unión del anticuerpo u otra propiedad funcional de interés se pueden evaluar en pruebas *in vitro* o *in vivo* como se describen aquí y se proveen en los ejemplos. Preferiblemente se introducen modificaciones conservativas. Las modificaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos, pero preferiblemente son sustituciones. Normalmente se hacen

37

no más de cinco, preferiblemente no más de cuatro, de preferencia no más de tres, de preferencia no más de dos, muy de preferencia no más de una modificación de aminoácido dentro de una región CDR.

Así, la presente revelación también provee un anticuerpo
5 humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una modificación de aminoácido que comprende la sustitución de aminoácido Y32F dentro de la CDR1 de cadena pesada, o que comprende una modificación de aminoácido que comprende la sustitución de aminoácido Y58F o Y59F dentro de la CDR2 de cadena pesada, o que comprende una
10 modificación de aminoácido que comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en Y96F, Y97F, Y98F y Y100_BF dentro de la CDR3 de cadena pesada. Las modificaciones de aminoácido preferidas del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo son la sustitución de aminoácido Y32F dentro de la CDR1 de cadena pesada, y las
15 sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y96F, Y97F, Y98F y Y100_BF dentro de la CDR3 de la cadena pesada. Las modificaciones de aminoácido más preferidas del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo son la sustitución de aminoácido Y32F dentro de la CDR1 de cadena pesada, o la sustitución de aminoácido Y100_BF dentro de la
20 CDR3 de cadena pesada.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que comprende una modificación de aminoácido que comprende la sustitución de aminoácido Y32F dentro de la CDR1 de cadena ligera, o que comprende una modificación de aminoácido
25 que comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en N92A, T93A y T93V dentro de la CDR3 de cadena ligera. Las modificaciones de aminoácido preferidas del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo son la sustitución de aminoácido Y32F dentro de la

H4

CDR1 de cadena ligera, o la sustitución de aminoácido N92A dentro de la CDR3 de la cadena ligera. En algunas modalidades, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una modificación de aminoácido que comprende la

5 sustitución de aminoácido Y32F dentro de la CDR1 de cadena pesada, o que comprende una modificación de aminoácido que comprende la sustitución de aminoácido Y58F o Y59F dentro de la CDR2 de cadena pesada, o que comprende una modificación de aminoácido que comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en Y96F,

10 Y97F, Y98F y Y100_BF dentro de la CDR3 de cadena pesada, y que comprende una modificación de aminoácido que comprende la sustitución de aminoácido Y32F dentro de la CDR1 de cadena ligera, o que comprende una modificación de aminoácido que comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en N92A, T93A y T93V dentro de la

15 CDR3 de cadena ligera.

En algunas modalidades se pueden usar secuencias de armazón para construir por ingeniería regiones variables para producir anticuerpos variantes. Los anticuerpos variantes de la invención incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones a los residuos de armazón dentro de VH o

20 VK, por ejemplo para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente dichas modificaciones de armazón se hacen para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una aproximación es "retromutar" uno o más residuos de armazón a la secuencia murina correspondiente, o "retromutar" uno o más residuos de armazón a una secuencia de línea germinal

25 correspondiente.

Así, en un aspecto adicional, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, en donde por lo menos una de las regiones de armazón de la región variable

de cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de armazón correspondiente de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino correspondiente. Preferiblemente, la modificación de aminoácido es una sustitución de aminoácido. Normalmente se hacen no más de cinco, preferiblemente no más de cuatro, de preferencia no más de tres, de preferencia no más de dos, de preferencia no más de una modificación de aminoácido dentro de una región de armazón.

En algunas modalidades, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, en donde la modificación de aminoácido de las regiones de armazón de la región variable de cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 37, 42, 48, 49, 67, 71, 78 y 94. La sustitución de aminoácido preferida de las regiones de armazón de la región variable de cadena pesada son las posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en 42, 67, 71, 78 y 94. Las sustituciones de aminoácido más preferidas de las regiones de armazón de la región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en G42R, F67L, R71K, L78V y R94K, con la condición de que si la modificación de aminoácido es R94K, la secuencia de la región variable de cadena pesada no es el SEQ ID NO: 19 ni el SEQ ID NO: 20, en donde R94K es la sustitución de aminoácido más preferida de las regiones de armazón de la región variable de cadena pesada.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, en donde por lo menos una de las regiones de armazón de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de armazón

correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente. Preferiblemente, la modificación de aminoácido es una sustitución de aminoácido. Normalmente se hacen no más de cinco, preferiblemente no más de cuatro, de preferencia no más de tres, muy de preferencia no más de dos, muy de preferencia no más de una modificación de aminoácido dentro de una región de armazón. En algunas modalidades, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, en donde la modificación de aminoácido de las regiones de armazón de la secuencia de la región variable de cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 44, 71 y 87. Las sustituciones preferidas de aminoácido de las regiones de armazón de la secuencia de la región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en P44V, P44I, P44L, F71Y, F71H, F71S, F71T y Y87F. Las sustituciones de aminoácido más preferidas de las regiones de armazón de la secuencia de la región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en P44V, P44I, F71Y y Y87F, en donde se prefiere particularmente P44I.

En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la presente invención puede comprender modificaciones de aminoácido de las regiones de armazón de la secuencia de la región variable de cadena pesada como se indica arriba, y modificaciones de aminoácido de las regiones de armazón de la secuencia de la región variable de cadena ligera como se indica arriba.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 y 55, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 37,

A
X

43 y 47, de preferencia seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 37 y 47.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 y 63, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 25, 59 y 60, de preferencia seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 59 y 60.

En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 y 55, y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 y 63.

En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 37, 43 y 47, y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 25, 59 y 60. En modalidades más preferidas, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 37 y 47, y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 59 y 60. Se prefiere más un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 37, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del

48

SEQ ID NO: 59; un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano que comprende una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 47, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:

5 60; un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 47, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 59; un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une

10 al CD19 humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 37, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 25; un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano que comprende una región variable de cadena pesada que

15 comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 37, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 49; un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano que comprende una región variable de cadena pesada que

20 comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 47, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 49; o un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 43, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del

25 SEQ ID NO: 59; en particular, un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 37, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de



aminoácidos del SEQ ID NO: 59; un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 47, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 60; un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 47, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 59.

10 Dado que cada una de estas secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden unir al CD19 humano, las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden "mezclar y hacer coincidir" para crear las moléculas de unión anti-CD19 de la invención. La unión a CD19 de dichos anticuerpos "mixtos y hechos coincidir" se puede
15 probar usando las pruebas de unión descritas por ejemplo en la sección de Ejemplos.

 En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 64, y
20 una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 66, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de
25 aminoácidos del SEQ ID NO: 67. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 66, y una secuencia de cadena ligera que

50

comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano y que además comprende un dominio constante pesado o ligero de humano. Las

5 regiones constantes pesadas humanas se pueden seleccionar del grupo de inmunoglobulinas humanas que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE, en donde se prefiere la IgG de región constante pesada humana, en particular IgG1. La región constante ligera humana se puede seleccionar del grupo de inmunoglobulinas humanas que consiste en

10 las regiones constantes *kappa* o *lambda*, en donde se prefiere la región constante *kappa* humana. En algunas modalidades preferidas el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende un dominio constante pesado de IgG1 humana y un dominio constante *kappa* ligero humano. La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo

15 que se une a CD19 humano que comprende regiones constantes pesadas o ligeras de humano, en donde la región constante pesada humana comprende una variante isotípica que comprende la CH1 de IgG1 humana, el gozne de IgG1 humana y la región Fc de IgG3 humana. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado que comprende la variante isotípica es un anticuerpo de longitud

20 completa. Un anticuerpo humanizado particularmente preferido, o fragmento del mismo, que se une al CD19 humano y que comprende una variante isotípica que comprende la CH1 de IgG1 humana, el gozne de IgG1 humana y la región Fc de IgG3 humana, comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 124 y una

25 secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65. Se ha encontrado que la variante isotípica presenta una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mejorada en comparación con un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19

5

humano, que comprende una región constante pesada humana de IgG1 humana (que usualmente es una IgG1 nativa), esto es, cuando se compara con un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que solo difiere de la variante isotípica con respecto a la región
5 constante pesada modificada.

La presente revelación también provee un fragmento de un anticuerpo humanizado que se une al CD19 humano, seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, dímeros Fv biespecíficos de una sola cadena, dianticuerpos, trianticuerpos y scFv
10 fusionado genéticamente con el mismo anticuerpo o un anticuerpo diferente. Los fragmentos preferidos son scFv, dímeros de Fv biespecíficos de una sola cadena y dianticuerpos. La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado de longitud completa que se une al CD19 humano.

Además de, o alternativamente a las modificaciones hechas
15 dentro de las regiones de armazón o regiones CDR, los anticuerpos de la invención se pueden modificar por ingeniería para incluir modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la vida media en el suero, fijación del complemento, unión al receptor de Fc, o citotoxicidad celular dependiente de
20 antígeno. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir al anticuerpo una o más porciones químicas), o se puede modificar para alterar su glicosilación. Cada una de estas modalidades se describe más abajo en mayor detalle. Las modificaciones dentro de la región Fc como se expone abajo son de acuerdo
25 con la numeración de residuos de la región Fc según el índice EU de Kabat. En una modalidad, la región de gozne de CH1 se modifica de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región de gozne se altera, por ejemplo se aumenta o disminuye. Esta aproximación se describe adicionalmente en la



patente de EE. UU. No. 5,677,425 de Bodmer *et al.* El número de residuos de cisteína en la región de gozne de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamble de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo. En otra modalidad, la región de gozne de Fc de un anticuerpo se muta para reducir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácido en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-gozne, de tal manera que se deteriora la unión del anticuerpo con la proteína A estafilocócica (SpA) con respecto a la unión de SpA del dominio nativo Fc-gozne. Esta aproximación se describe en mayor detalle en la patente de EE. UU. No. 6,165,745 de Ward *et al.* En otra modalidad, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida media biológica. Son posibles varias aproximaciones. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE. UU. No. 6,277,375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión a receptor de salvamento tomado de dos asas de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de EE. UU. Nos. 5,869,046 y 6,121,022, de Presta *et al.* En una modalidad adicional, la región Fc se altera reemplazando por lo menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido diferente, de tal manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero se retiene la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser por ejemplo un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Esta



aproximación se describe en mayor detalle en las patentes de EE. UU. Nos. 5,624,821 y 5,648,260, ambas de Winter *et al.* En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 329, 331 y 322 se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido diferente, de tal manera

5 que el anticuerpo tenga una unión alterada a C1q, o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Esta aproximación se describe en mayor detalle en la patente de EE. UU. No. 6,194,551 de Idusogie *et al.* En otro ejemplo, se alteran uno o más residuos de aminoácido dentro de las posiciones de aminoácido 231 a 238 en la región N-terminal del

10 dominio CH2 para alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Esta aproximación se describe adicionalmente en la publicación de PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.* En otro ejemplo, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), o para aumentar la

15 afinidad del anticuerpo por un receptor de Fc[*gamma*], modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373,

20 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Esta aproximación se describe adicionalmente en la publicación de PCT WO 00/42072 de Presta. Así, en una modalidad preferida, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una región Fc variante de IgG humana que

25 comprende por lo menos una modificación de aminoácido con respecto a la región de Fc de IgG humana del anticuerpo progenitor, en donde el anticuerpo que comprende la región Fc variante de IgG humana presenta una función efectora alterada en comparación con el anticuerpo progenitor.

37

Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región Fc variante de IgG1 humana. De preferencia es un anticuerpo de longitud completa que comprende una región Fc variante de IgG1 humana. El anticuerpo progenitor es un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano y es igual al anticuerpo humanizado que se une al CD19 humano que comprende una región Fc variante de IgG1 humana, excepto por la modificación de aminoácido en la región Fc de IgG humana, y usualmente es un anticuerpo con una región Fc nativa de IgG humana. Preferiblemente la modificación de aminoácido no es isotípica.

10 La función efectora alterada usualmente es la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), o la unión a C1q, o citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), o la afinidad de unión del anticuerpo por un receptor de Fc[*gamma*], preferiblemente la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC). La CDC, unión a C1q, ADCC y la afinidad de unión del anticuerpo por un receptor de Fc[*gamma*], se miden mediante pruebas estándares *in vitro* que son conocidas y están disponibles comercialmente. Usualmente la ADCC se mide por medio de la prueba de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) como se describe por ejemplo en el Ejemplo 4 de la presente solicitud, y la CDC se mide por medio de la prueba basada en célula que se describe por ejemplo en el Ejemplo 10 de la presente solicitud.

En una modalidad, la modificación de aminoácido que altera la función efectora en comparación con el anticuerpo progenitor, comprende una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 269, 274, 276, 298, 324 y 334, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en 269, 298 y 324, de preferencia 298 o 324, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica

E3

utilizando el sistema de numeración de Kabat. En una modalidad adicional, la modificación de aminoácido que altera la función efectora en comparación con el anticuerpo progenitor comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en E269D, K274Q, N276K, S298A, 5 S324N y K334R, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en E269D, S298A y S324N, de preferencia S298A o S324N, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

En una modalidad adicional, la modificación de aminoácido que 10 altera la función efectora en comparación con el anticuerpo progenitor comprende una combinación de sustituciones de aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 269/274, 269/276, 269/298, 269/324, 269/334, 274/276, 274/298, 274/324, 274/334, 276/298, 276/324, 276/334, 298/324, 298/334, 324/334, 269/274/276, 269/274/298, 15 269/274/324, 269/274/334, 269/276/298, 269/276/324, 269/276/334, 269/298/324, 269/298/334, 274/276/298, 274/276/324, 274/276/334, 274/298/324, 274/298/334, 276/298/324 y 276/298/334, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en 274/276, 269/298, 298/324, 274/276/334 y 269/298/324, muy de preferencia seleccionada del grupo que 20 consiste en 298/324 y 269/298/324, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

En una modalidad adicional, la modificación de aminoácido que altera la función efectora en comparación con el anticuerpo progenitor 25 comprende una combinación de sustituciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en E269D/K274Q, E269D/N276K, E269D/S298A, E269D/S324N, E269D/K334R, K274Q/N276K, K274Q/S298A, K274Q/S324N, K274Q/K334R, N276K/S298A, N276K/S324N, N276K/K334R, S298A/S324N,

S298A/K334R, S324N/K334R, E269D/K274Q/N276K, E269D/K274Q/S298A,
 E269D/K274Q/S324N, E269D/K274Q/K334R, E269D/N276K/S298A,
 E269D/N276K/S324N, E269D/N276K/K334R, E269D/S298A/S324N,
 E269D/S298A/K334R, K274Q/N276K/S298A, K274Q/N276K/S324N,
 5 K274Q/N276K/K334R, K274Q/S298A/S324N, K274Q/S298A/K334R,
 N276K/S298A/S324N y N276K/S298A/K334R, preferiblemente seleccionada
 del grupo que consiste en K274Q/N276K, E269D/S298A, S298A/S324N,
 K274Q/N276K/K334R y E269D/S298A/S324N, de preferencia seleccionada
 del grupo que consiste en S298A/S324N y E269D/S298A/S324N, en donde la
 10 posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el
 sistema de numeración de Kabat.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-CD19 humanizado de la
 presente revelación que comprende la región Fc variante de IgG humana
 presenta una CDC mejorada en una prueba *in vitro* como se describe arriba
 15 en comparación con el anticuerpo progenitor. La presencia de una CDC
 mejorada, como se usa aquí, incluye: (a) CDC mejorada en comparación con
 el anticuerpo progenitor, esto es, el anticuerpo progenitor ya presenta CDC la
 cual es intensificada por la modificación de aminoácido de la región Fc de IgG
 humana, y (b) CDC *de novo* en comparación con el anticuerpo progenitor,
 20 esto es, el anticuerpo progenitor no presentaba CDC, y de esta manera se ha
 introducido CDC *de novo* con la modificación de aminoácido de la región Fc
 de IgG humana.

En una modalidad adicional, las variantes de la región Fc de IgG
 humana del anticuerpo anti-CD19 humanizado de la presente invención, que
 25 presentan CDC mejorada en una prueba *in vitro* en comparación con el
 anticuerpo progenitor, comprenden una sustitución de aminoácido o una
 combinación de sustituciones de aminoácido, o una combinación de
 sustituciones de aminoácido en las posiciones de aminoácido seleccionadas

del grupo que consiste en 324, 334, 274/276, 298/324, 274/276/334 y 269/298/324, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en 324, 334, 298/324, 274/276/334 y 269/298/324, de preferencia seleccionada del grupo que consiste en 324, 298/324 y 269/298/324, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

En una modalidad adicional, las variantes de la región Fc de IgG humana del anticuerpo anti-CD19 humanizado de la presente invención, que presentan CDC mejorada en una prueba *in vitro* en comparación con el anticuerpo progenitor, comprenden una sustitución de aminoácido o una combinación de sustituciones de aminoácido en las posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en S324N, K334R, K274Q/N276K, S298A/S324N, K274Q/N276K/K334R y E269D/S298A/S324N, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en S324N, K334R, S298A/S324N, K274Q/N276K/K334R y E269D/S298A/S324N, de preferencia seleccionada del grupo que consiste en S324N, S298A/S324N y E269D/S298A/S324N, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

En una modalidad adicional, las variantes de la región Fc de IgG humana del anticuerpo anti-CD19 humanizado de la presente invención, que presentan ADCC mejorada en una prueba *in vitro* en comparación con el anticuerpo progenitor, comprenden una sustitución de aminoácido o una combinación de sustituciones de aminoácido en las posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en 269, 298, 269/298, 269/324, 298/324, y 269/298/324, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en 298, 269/298, 269/298/324, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

En una modalidad adicional, las variantes de la región Fc de IgG

humana del anticuerpo anti-CD19 humanizado de la presente invención, que presentan ADCC mejorada en una prueba *in vitro* en comparación con el anticuerpo progenitor, comprenden una sustitución de aminoácido o una combinación de sustituciones de aminoácido en la posición de aminoácido
5 seleccionada del grupo que consiste en E269D, S298A, E269D/S298A, E269D/S324N, S298A/S324N y E269D/S298A/S324N, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en S298A, E269D/S298A y E269D/S298A/S324N, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

10 Así, los anticuerpos humanizados particularmente preferidos o los fragmentos de los mismos provistos por la presente revelación, que se unen al C19 humano y presentan una función efectora alterada en comparación con el anticuerpo humanizado progenitor, son anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que comprenden una secuencia de
15 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 114 (VH16 R94K/S298A) y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65 (VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A); una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 115 (VH16 R94K/E269D/S298A) y una
20 secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65 (VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A); una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 116 (VH16 R94K/ S298A/S324N) y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65 (VL43
25 V3Q/T7S/P44I/N92A); una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 117 (VH16 R94K/E269D/S298A/S324N) y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65 (VL43



V3Q/T7S/P44I/N92A); una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 118 (VH16 R94K/S324N) y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65 (VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A); una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 119 (VH16 R94K/K274Q) y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65 (VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A); una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 120 (VH16 R94K/N276K) y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65 (VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A); una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 121 (VH16 R94K/K334R) y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65 (VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A); una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 122 (VH16 R94K/K274Q/N276K) y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65 (VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A); o una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 123 (VH16 R94K/K274Q/N276K/K334R) y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65 (VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, en donde el anticuerpo comprende una región Fc variante de IgG humana que comprende la sustitución de aminoácido S324N, que reemplaza la serina en la posición de aminoácido 324 del anticuerpo progenitor con asparagina, en donde el anticuerpo que comprende la región Fc variante de IgG humana presenta una

citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mejorada en comparación con el anticuerpo progenitor. Preferiblemente el anticuerpo comprende una región Fc variante de IgG1 humana. Se prefiere más un anticuerpo de longitud completa que comprende una región Fc variante de IgG1 humana.

- 5 Se ha encontrado sorprendentemente que entre 16 sustituciones de aminoácido diferentes en la posición de aminoácido 324, la sustitución S324N mejora significativamente la CDC en comparación con el anticuerpo progenitor, mientras que las otras sustituciones no mejoran la CDC en comparación con el anticuerpo progenitor, como se describe en el Ejemplo 10.
- 10 Sin desear limitarse por teoría, parece que este efecto selectivo inesperado sobre la CDC de la sustitución S324N se debe a una unión intensificada al componente del complemento humano C1q.

- La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que
- 15 comprende una región Fc de IgG humana, en donde la estructura central de carbohidrato madura unida a la región Fc de IgG humana carece de fucosa. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región Fc de IgG1 humana, en donde la estructura central de carbohidrato madura unida a la región Fc de IgG1 humana carece de fucosa. Se prefiere más un anticuerpo de longitud
- 20 completa que comprende una región Fc de IgG1 humana en donde la estructura central de carbohidrato madura unida a la región Fc de IgG1 humana carece de fucosa. Se sabe de WO 2003/035835 que la falta de fucosa en la estructura central de carbohidrato madura unida a la región Fc de IgG humana puede aumentar la ADCC. Así, en una modalidad adicional, el
- 25 anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la presente revelación comprende una región Fc de IgG humana en donde la estructura central de carbohidrato madura unida a la región Fc de IgG humana carece de fucosa, en donde el anticuerpo que carece de fucosa presenta una ADCC

intensificada en comparación con el anticuerpo humanizado progenitor o fragmento del mismo que no carece de fucosa. Un anticuerpo preferido o fragmento del mismo que se une a CD19 humano, que comprende una región Fc de IgG humana en donde la estructura central de carbohidrato madura unida a la región Fc de IgG humana carece de fucosa, en donde el anticuerpo que carece de fucosa presenta una ADCC mejorada en comparación con el anticuerpo humanizado progenitor o un fragmento del mismo que no carece de la fucosa, es el anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 64 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65. Los métodos para generar anticuerpos que carecen de fucosa son, por ejemplo: (a) el uso de una célula hospedera mutante o construida por ingeniería que es deficiente en el metabolismo de fucosa, de tal manera que tiene una capacidad reducida (o es incapaz de) fucosilar proteínas expresadas en las mismas; (b) cultivar células bajo condiciones que previenen o reducen la fucosilación; (c) la eliminación de fucosa posterior a la traducción (por ejemplo, con una enzima fucosidasa); (d) la adición del carbohidrato deseado posteriormente a la traducción, por ejemplo después de la expresión recombinante de una glicoproteína no glicosilada; o (e) purificación de la glicoproteína a fin de seleccionar el producto que no está fucosilado. Preferiblemente se usan los métodos descritos en el ejemplo 14, por ejemplo los métodos descritos por Longmore *et al.* (1982), *Carbohydr. Res.* 365-92, o en Imai-Nishiya *et al.* (2007), *BMC Biotechnol.* 7, 84.

25 Propiedades de los anticuerpos anti-CD19

Se conocen las pruebas estándares para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos, por ejemplo al CD19 humano, que incluyen por ejemplo las pruebas ELISA, Western blot, RIA y análisis de citometría de flujo.



Las pruebas adecuadas se describen detalladamente en la sección de ejemplos. La cinética de unión de los anticuerpos (por ejemplo la afinidad de unión como K_d) también se puede evaluar mediante las pruebas estándares conocidas, tales como el análisis de Scatchard o Biacore<(R)> que se pueden

5 realizar y calcular como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 3. La afinidad de unión relativa K_i se puede evaluar por medio de una prueba de competencia estándar conocida, y se puede hacer y calcular por ejemplo como se describe en el ejemplo 3. Para evaluar la unión se pueden usar células de tumor de Raji (linfoma de Burkitt humano, DSMZ ACC319), NALM-

10 6 (leucemia de precursores de células B humanas, DSMZ ACC128) o SU-DHL-6 (linfoma de células B humanas, DSMZ ACC572); preferiblemente se usan células de tumor de Raji, tales como de linfoma de Burkitt humano, DSMZ ACC319 o SU-DHL-6 (linfoma de células B humanas, DSMZ ACC572), de preferencia células de tumor de Raji, tales como linfoma de Burkitt

15 humano, DSMZ ACC319. Las células se pueden obtener de fuentes públicamente disponibles tales como el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania, y se pueden usar en pruebas estándares tales como análisis de citometría de flujo. El anticuerpo quimérico resultante que se puede usar en las pruebas de la

20 presente invención usualmente es una versión quimérica del anticuerpo murino FMC63 que consiste en el dominio variable pesado murino FMC63 fusionado con dominios constantes pesados de IgG1 humana, y el dominio variable ligero murino fusionado con el dominio constante *kappa*. El anticuerpo quimérico correspondiente que se usa preferiblemente en las

25 pruebas de la presente invención es una versión quimérica del anticuerpo FMC63 que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 68, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 69. El

anticuerpo no humanizado progenitor o el anticuerpo no humanizado progenitor correspondiente que se pueden usar en las pruebas de la presente invención usualmente son un anticuerpo murino, en particular el anticuerpo murino FMC63.

5 La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a células de tumor de Raji con una florescencia de punto medio (MPF) de por lo menos 10% con respecto a la unión del anticuerpo quimérico correspondiente. Las células de tumor de Raji expresan CD19 sobre su superficie a la que se puede unir el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo. Los valores de fluorescencia de punto medio se pueden obtener midiendo la intensidad fluorescente media (MFI) de células marcadas usando citometría de flujo, contra la concentración de anticuerpo. Preferiblemente el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo se une a células de tumor de Raji con una MPF de por lo menos 30%, de preferencia por lo menos 50%, de preferencia por lo menos 70%, en particular por lo menos 80%, más en particular por lo menos 90%, más en particular por lo menos 95% con respecto a la unión del anticuerpo quimérico correspondiente. Las células de tumor de Raji que se describen arriba se pueden usar para evaluar la unión a CD19.

20 La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano con una afinidad (K_d) de 50 nM o menor, en particular 40 nM o menor, más en particular 30 nM o menor, más en particular 20 nM o menor, más en particular 15 nM o menor. Las células de tumor de Raji que se describen arriba se pueden usar para evaluar la unión al CD19 humano.

25 La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que retiene por lo menos 20% de la afinidad de unión (K_d) a CD19 del anticuerpo quimérico correspondiente.

64

Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo retiene por lo menos 40%, de preferencia por lo menos 60%, de preferencia por lo menos 80%, en particular por lo menos 90%, más en particular por lo menos 95% de la afinidad de unión (K_d) a CD19 del anticuerpo quimérico correspondiente.

- 5 Las células de tumor de Raji o las células SU-DHL-6 que se describen arriba se pueden usar para evaluar la unión al CD19 humano.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano y compete por la unión a las células de tumor de Raji con una afinidad (K_i) de 50 nM o menor, preferiblemente 20 nM o menor, de preferencia 10 nM o menor, de preferencia 5 nM o menor, en particular 4 nM o menor, mas en particular 3 nM o menor, mas en particular por lo menos de aproximadamente 1.5 nM a aproximadamente 5.0 nM (por ejemplo, 1.9; 1.6 o 2.9 a aproximadamente 2.6 o 4.9 nM). La competencia por la unión usualmente se mide contra el anticuerpo quimérico correspondiente, en donde se pueden usar las células de tumor de Raji que se describen arriba para evaluar la K_i .

10
15

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano e induce apoptosis en células de tumor de Raji. La inducción de apoptosis en las células de tumor de Raji se puede medir por medio de marcación con annexin V y yoduro de propidio (Vermes *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods*. 184: 39-51). La inducción de la apoptosis es una propiedad muy sorprendente presentada por los anticuerpos humanizados de la presente invención, en vista del hecho de que el anticuerpo quimérico correspondiente no tiene efecto sobre la apoptosis. Las células de tumor de Raji que se describen arriba se pueden usar para evaluar la apoptosis. Así, la presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo en donde es inducida apoptosis en por lo menos 10% de las células de tumor de Raji, de

20
25



preferencia en por lo menos 15%, de preferencia en por lo menos 20%, de preferencia en por lo menos 25%.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano e induce ADCC en células de tumor de Raji. La lisis específica relacionada con ADCC de células objetivo como las células de tumor de Raji que se describen arriba, se puede evaluar usando por ejemplo una prueba de lactato deshidrogenasa (prueba no radioactiva Cyto Tox 96, Promega, Madison, EE. UU.). Sorprendentemente, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano induce una ADCC en células de tumor de Raji equivalente o aún mayor a la inducción de ADCC causada por el anticuerpo quimérico correspondiente. Preferiblemente el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo que se une a CD19 tiene por lo menos 80% de la ADCC del anticuerpo quimérico correspondiente, de preferencia por lo menos 100%, de preferencia por lo menos 120%.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano y que inhibe la proliferación de células B malignas. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo retiene por lo menos 60% de la inhibición de proliferación de células B malignas del anticuerpo quimérico correspondiente, de preferencia por lo menos 80%, de preferencia por lo menos 90%, en particular 95%, más en particular 100%. Para medir la inhibición de proliferación de células causada por los anticuerpos, se pueden usar las células de tumor de Raji o células SU-DHL-6 que se describen arriba para evaluar la proliferación de las células B malignas.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano y que inhibe la clonogenicidad de las células de tumor de Raji. La inhibición de la



clonogenicidad se mide contando el número de clones después de tratamiento con el anticuerpo, y se puede efectuar de acuerdo con Nahimana *et al.*, 2009, *Blood*. 0: blood-2008-08-173369v1" (*Blood*, 2009, Vol. 113, No. 14, p. 3276-3286) . Las células de tumor de Raji que se describen arriba se pueden usar
5 para evaluar la clonogenicidad. El número de clones contados después de tratamiento con los anticuerpos humanizados de la invención es por lo menos 30% menor que el número de clones contados después de tratamiento con el anticuerpo quimérico correspondiente, preferiblemente por lo menos 40%, de preferencia por lo menos 50%, de preferencia por lo menos 60%. La
10 inhibición de la clonogenicidad de las células de tumor de Raji confirma la fuerte función inhibidora de los anticuerpos humanizados de la invención sobre la proliferación de células B.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano y que causa
15 agotamiento de las células B de la sangre. Preferiblemente, el agotamiento de células B causado es por lo menos idéntico, preferiblemente por lo menos 1.5 veces mayor, de preferencia por lo menos 2 veces mayor que el agotamiento de células B causado por el anticuerpo quimérico correspondiente. El agotamiento de células B se puede evaluar determinando
20 el porcentaje de células B positivas en la sangre completa después de incubación con el anticuerpo como se describe en los ejemplos.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano y que se interna en las células de tumor de Raji. El anticuerpo humanizado o
25 fragmento de la presente invención se interna a un grado comparable con el grado de internamiento del anticuerpo quimérico correspondiente. Preferiblemente, el grado de internamiento del anticuerpo humanizado de la invención, usado a 0.01 µg/ml, es entre 50% y 150%, de preferencia entre

60% y 140%, de preferencia entre 70% y 130% del grado de internamiento del anticuerpo quimérico correspondiente. El internamiento del anticuerpo se puede evaluar en las células de tumor de Raji que se describen arriba usando por ejemplo un anticuerpo secundario anti-humano conjugado con la toxina saporina (Hum-Zap, Advanced Targeting Systems, San Diego, California, EE. UU.).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano, que tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor de 65°C, de preferencia mayor de 70°C, de preferencia mayor de 75°C, de preferencia mayor de 80°C. Para el análisis de la termoestabilidad del fragmento FAB se usa calorimetría de barrido diferencial, en donde se identifica una temperatura de fusión de punto medio del fragmento FAB en el contexto de una IgG de longitud completa. Este tipo de mediciones calorimétricas son conocidas para el experto en la materia y se pueden realizar por ejemplo de acuerdo con Garber y Demarest (2007), *BBRC* 355:751-7. Sorprendentemente, se ha encontrado que el anticuerpo humanizado de la presente invención tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB equivalente al anticuerpo quimérico correspondiente. Así, la presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a CD19 humano, que tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB equivalente a la temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB del anticuerpo quimérico correspondiente.

25 Ácidos nucleicos, vectores y células hospederas

La presente revelación también provee ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos que se unen a CD19 humano; vectores y células hospederas que comprenden el

ácido nucleico o el vector. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente pura o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es "aislado" o "se hace sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por medio de técnicas estándares que incluyen tratamiento alcalino/SDS, análisis de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros muy conocidos; véase por ejemplo F. Ausubel, *et al*, ed. (1987) "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser por ejemplo ADN o ARN, y puede o no contener secuencias intrónicas. En una modalidad preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener usando técnicas estándares de biología molecular, por ejemplo se pueden obtener ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo o que codifican los segmentos VH y VL, por medio de amplificación de PCR estándar o técnicas de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una colección de genes de inmunoglobulina (por ejemplo usando técnicas de despliegue en fago) se pueden recuperar de la colección uno o más ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo. Los métodos para introducir un ácido nucleico exógeno en las células hospederas son muy conocidos y variarán según la célula hospedera utilizada. Las técnicas incluyen, sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación por fosfato de calcio, tratamiento con cloruro de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplasto, electroporación, infección viral o de fago, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos. En el caso de células de mamífero, la transfección puede ser transitoria o estable.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas de la invención son las que codifican la región variable de cadena ligera selecciona del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 y 63, o la región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 y 55. De preferencia son moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 64, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifican una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 66, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 67; o que codifican una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 66, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifican una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 114, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifican una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 115, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifican una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 116, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifican una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 117, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifican una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 118, y una

secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifica una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 119, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del

5 SEQ ID NO: 65; o que codifica una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 120, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifica una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 121, y una

10 secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifica una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 122, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifica una secuencia de cadena pesada que

15 comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 123, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65; o que codifica una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 124, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del

20 SEQ ID NO: 65.

La presente revelación también provee un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de una variante de FMC63 humanizada que se une al CD19 humano, depositado en un microorganismo en el DSMZ el 5 de febrero de 2010, que

25 tiene el No. de registro DSM 23302. La cadena pesada codificada por la secuencia de ácido nucleico depositado de una variante de FMC63 humanizada que se une al CD19 humano comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, una

CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29.

La presente revelación también provee un ácido nucleico aislado

5 que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de una variante de FMC63 humanizada que se une al CD19 humano, depositado en un microorganismo en el DSMZ el 5 de febrero de 2010, que tiene el No. de registro DSM 23303. La cadena ligera codificada por la

10 secuencia de ácido nucleico depositado de una variante de FMC63 humanizada que se une al CD19 humano comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.

15 Así, la presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, codificado por el ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de una variante de FMC63 humanizada que se une al CD19 humano, depositado en un microorganismo en el DSMZ el 5 de

20 febrero de 2010, que tiene el No. de registro DSM 23302, y el ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de una variante de FMC63 humanizada que se une al CD19 humano, depositado en un microorganismo en el DSMZ el 5 de febrero de 2010, que tiene el No. de registro DSM 23303.

25 En una modalidad, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, que se une al CD19 humano, codificado por el ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de una variante de FMC63 humanizada que se une al CD19 humano,

depositado en un microorganismo en el DSMZ el 5 de febrero de 2010, que tiene el No. de registro DSM 23302, comprende una región Fc variante de IgG humana, preferiblemente una región Fc variante de IgG1 humana, que comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido
5 seleccionada del grupo que consiste en 269, 274, 276, 298, 324 y 334, de preferencia seleccionada del grupo que consiste en 269, 298 y 324, muy de preferencia 298 o 324, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican
10 los segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN se pueden manipular más por medio de técnicas estándares de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de anticuerpo de longitud completa, o en fragmentos de genes que corresponden a los fragmentos descritos arriba como los genes del fragmento FAB o un gen scFv. En estas
15 manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se enlaza operativamente con otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, por ejemplo una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "enlazado operativamente", como se usa en este contexto, significa los dos fragmentos de ADN están unidos de tal manera que las secuencias de
20 aminoácido codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco. El ADN aislado que codifica la región VH puede ser convertido en un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN que codifica VH con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los
25 genes humanos de la región constante de cadena pesada son conocidos (véase por ejemplo Kabat, E. A., *et al.* (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), y los fragmentos de ADN que abarcan

estas regiones se pueden obtener mediante amplificación estándar de PCR. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, de preferencia es una región constante de IgG1. Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el

5 ADN que codifica V[pi] se puede enlazar operativamente con otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de cadena pesada. El ADN aislado que codifica la región VL se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como también en un gen de cadena ligera de Fab), enlazando operativamente el ADN que codifica VL con otra molécula de

10 ADN que codifica la región constante de cadena ligera ,CL. Las secuencias de los genes humanos de la región constante de cadena ligera son conocidas (véase por ejemplo Kabat, E. A., *et al.* (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), y los fragmentos de ADN que abarcan

15 estas regiones se pueden obtener por medio de amplificación de PCR estándar. En modalidades preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante *kappa* o *lambda*, preferiblemente una región constante *kappa*. Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se enlazan operativamente con otro fragmento que codifica

20 un enlazador, por ejemplo que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-ser)3, de tal manera que las secuencias VH y VL pueden ser expresadas como una proteína de una sola cadena contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase por ejemplo Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883;

25 McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554). Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo de anticuerpos humanizados. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase por ejemplo Morimoto *et al.*,

Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, ahora estos fragmentos pueden ser producidos directamente por medio de células hospederas recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las colecciones de fago de anticuerpo expuestas arriba. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otra aproximación, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células hospederas recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la materia. En otras modalidades, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de una sola cadena (scFv), véase por ejemplo WO 1993/16185; patente de EE. UU. No. 5,571,894; y patente de EE. UU. No. 5,587,458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo como se describe en la patente de EE. UU. No. 5,641,870.

Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la presente invención se pueden incorporar en un vector de expresión para expresar la proteína. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión para la expresión de la proteína. Los vectores de expresión pueden comprender vectores de auto-replicación extracromosómica o vectores que se integran en el genoma de un hospedero. Los vectores de expresión se construyen para ser compatibles con el tipo de célula hospedera. Así, los vectores de expresión que se utilizan en la presente invención incluyen, sin limitación, los que permiten la expresión de la proteína en células de mamífero, bacterias, células de insecto, levadura y en sistemas *in vitro*. Como es conocido, se tiene disponible una variedad de vectores de expresión, comercialmente o de otra manera, que se pueden usar en la presente invención para expresar



anticuerpos.

Normalmente los vectores de expresión comprenden una proteína enlazada operativamente con secuencias de control o regulatorias, marcadores seleccionables, cualquier socio de fusión o elementos adicionales. Por "enlazado operativamente" se entiende aquí que el ácido nucleico se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. El término "secuencia regulatoria" incluye promotores, incrementadores y otros elementos de control de expresión (señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen por ejemplo en Goeddel ("Gene Expression Technology, Methods in Enzymology" 185, Academic Press, San Diego, California (1990)). Generalmente estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulatorio transcripcional y de traducción enlazado operativamente con el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, y son típicamente apropiados para la célula hospedera usada para expresar la proteína. En general, las secuencias regulatorias de transcripción y traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y detención de transcripción, secuencias de inicio y detención de traducción, y secuencias incrementadoras o activadoras. Como también sabe en la técnica, los vectores de expresión normalmente contienen un gen de selección o marcador para permitir la selección de células hospederas transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección son muy conocidos y variarán con la célula hospedera utilizada. Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexate, en una célula hospedera en la cual se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usarse en células hospederas dhfr con selección/amplificación de

metotrexate) y el gen neo (para la selección de G418).

Las células hospederas adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores en la presente son células de procarionte, levadura, o eucarionte superior. Los procariontes adecuados para este propósito incluyen eubacterias, incluso organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *Enterobacteriaceae*, tales como *Escherichia*, por ejemplo *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como también bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Los hospederos de clonación de *E. coli* adecuados incluyen *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325).

Además de los procariontes, los microbios eucarióticos tales como los hongos filamentosos o las levaduras son hospederos de clonación o expresión adecuados. La *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de pan común es de los microorganismos hospederos eucarióticos inferiores usados más comúnmente. Sin embargo, comúnmente están disponibles y son útiles otros géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospederos de *Kluyveromyces* que incluyen *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. Walth* (AJCC 56,500), *K. drosopmarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, o *K. marxianus* y *arrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos que incluyen *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, o *Aspergillus* tales como *A. nidulans* o *A. niger*.

Las células hospederas adecuadas para la expresión de los anticuerpos humanizados de la invención se derivan de organismos

multicelulares. Los ejemplos de células invertebradas incluyen plaril y células de insecto. Se han identificado muchas cepas baculovirales y variantes y células hospederas de insecto permisivas correspondientes de hospederos tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles una variedad de cepas virales para transfección, por ejemplo la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden usar, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

10 También se pueden utilizar como hospederos cultivos de células de planta de algodón, maíz, papa, soya, petunia, tomate y tabaco.

Las células hospederas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención son preferiblemente células hospederas de mamífero que incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen las células CHO dhfr<->, descritas por Urlaub y Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para usarse con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión del gen GS descrito en WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP 338841 (de Bebbington). Cuando se introducen genes de anticuerpo recombinantes en células hospederas de mamífero, los anticuerpos son producidos cultivando las células hospederas durante un periodo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospederas, o más preferiblemente para la secreción del anticuerpo hacia el medio de cultivo en el que crecen las células hospederas. Las células hospederas útiles para producir anticuerpos que se unen al CD19 humano se pueden cultivar en una variedad de medios. Los

79

medios adecuados para cultivar las células hospederas están disponibles comercialmente, tales como el F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma o Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma). Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando los métodos estándares de purificación de proteína.

Los anticuerpos se pueden enlazar operativamente a un socio de fusión para permitir el direccionamiento de la proteína expresada, su purificación, examen, despliegue, etc. Los socios de fusión se pueden enlazar con la secuencia de anticuerpo por medio de secuencias enlazadoras. La secuencia enlazadora generalmente comprenderá un pequeño número de aminoácidos, normalmente menos de diez, aunque también se pueden usar enlazadores más grandes. Normalmente las secuencias enlazadoras se seleccionan para ser flexibles y resistentes a la degradación. Como será apreciado por los expertos en la materia, se pueden usar como enlazadores cualesquiera de una amplia variedad de secuencias. Por ejemplo, una secuencia enlazadora común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Un socio de fusión puede ser una secuencia de direccionamiento o señal que dirige el anticuerpo y cualquier socio de fusión asociado a una localización celular deseada o al medio extracelular. Como se sabe, algunas secuencias de señalización pueden dirigir a una proteína para ser secretada hacia el medio de crecimiento o hacia el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula. Un socio de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o proteína que permite la purificación o examen. Tales socios de fusión incluyen, sin limitación, marcas de polihistidina (His-tags) (por ejemplo H6 y H10 u otras marcas para usarse con sistemas de cromatografía de afinidad en metal inmovilizado (IMAC) (por ejemplo, columnas de afinidad de Ni^{+2})), fusiones de GST, fusiones de

MBP, Strep-tag, la secuencia objetivo de biotilación de BSP de la enzima bacteriana BirA, y las marcas de epítopo que son alcanzadas por los anticuerpos (por ejemplo marcas c-myc, marcas flag-tag, etc.). Como será apreciado por los expertos en la materia, tales marcas pueden ser útiles para la purificación, examen, o ambas cosas.

Construcción y producción de anticuerpos

Los anticuerpos se pueden producir por medio de técnicas de ADN recombinante conocidas para los expertos en la materia. En anticuerpos adicionales se pueden producir por medio de corte enzimático o químico de anticuerpos naturales. Los anticuerpos humanizados de la presente invención se pueden construir transfiriendo una o más CDR o porciones de las mismas de las regiones VH o VL de un animal no humano (por ejemplo ratón), a una o más regiones de armazón de regiones VH o VL humanas. Opcionalmente, los residuos de armazón humanos así presentes en las regiones VH o VL pueden ser reemplazados por residuos no humanos correspondientes (por ejemplo de ratón) cuando se requiere o se desea para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo, o para mantener la afinidad de unión. Opcionalmente, los residuos de aminoácido no humanos presentes en las CDR se pueden reemplazar con residuos humanos. Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se describe arriba. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener del hibridoma no humano de interés y modificar por ingeniería para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo humanas), usando las técnicas estándares de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden enlazar con regiones constantes humanas usando los

41

métodos conocidos (véase por ejemplo la patente de EE. UU. No. 4,816,567 de Cabilly *et al*). Para crear un anticuerpo humanizado se pueden insertar regiones CDR murinas en un armazón humano usando los métodos conocidos (véase por ejemplo la patente de EE. UU. No. 5,225,539, de Winter, 5 y las patentes de EE. UU. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen *et al*).

Se pueden construir anticuerpos humanizados de la presente invención en donde la molécula aceptora humana para la región variable de cadena pesada se selecciona basándose en consideraciones de homología 10 entre regiones variables de la molécula aceptora potencial y la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino. Se prefieren las moléculas aceptoras humanas candidatas de línea germinal para reducir la posible inmunogenicidad. Las bases de datos de línea germinal se hacen de secuencias de anticuerpo que leen hasta el extremo de la región FW3 de 15 cadena pesada y parcialmente hasta la secuencia CDR3. Para la selección de una región FW4 se pueden buscar bases de datos de secuencias de anticuerpo maduro que han sido derivadas de la molécula de línea germinal seleccionada, o se pueden utilizar secuencias de anticuerpo que han sido derivadas de la molécula de línea germinal seleccionada de un donador 20 humano. Las moléculas aceptoras humanas se seleccionan preferiblemente de la misma clase de cadena pesada que la molécula donadora murina, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donadora murina. Las consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora humana para la región variable de cadena pesada evaden 25 la homología en la longitud de CDR entre la molécula donadora murina y la molécula aceptora humana. Las moléculas de anticuerpo aceptoras humanas se seleccionan preferiblemente por búsqueda de homología en la base de datos V-BASE, aunque también se pueden usar otras bases de datos tales

como la de Kabat, y las bases de datos públicas de NCBI.

Se pueden construir anticuerpos humanizados de la presente invención en donde la molécula aceptora humana para la región variable de cadena ligera se selecciona basándose en consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potencial y la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino. Se prefieren las moléculas aceptoras humanas candidatas de línea germinal para reducir la posible inmunogenicidad. Las bases de datos de línea germinal están hechas de secuencias de anticuerpo que leen hasta el final de la región FW3 de cadena pesada y parcialmente hasta la secuencia de CDR3. Para la selección de una región FW4 se pueden buscar bases de datos de secuencias de anticuerpo maduro que han sido derivadas de la molécula de línea germinal seleccionada, o se pueden utilizar secuencias de anticuerpo que han sido derivadas de la molécula de línea germinal seleccionada de un donador humano. Las moléculas aceptoras humanas se seleccionan preferiblemente de la misma clase de cadena ligera que la molécula donadora murina, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donadora murina. Consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora humana para la región variable de cadena ligera incluyen la homología en la longitud de CDR entre la molécula donadora murina y la molécula aceptora humana. Las moléculas aceptoras humanas de anticuerpo se seleccionan preferiblemente por búsquedas de homología en la base de datos V-BASE, y también se pueden usar otras bases de datos como la de Kabat y las bases de datos públicas de NCBI. Los métodos para humanizar un anticuerpo no humano se describen en la presente, incluso en la sección de ejemplos que se da más abajo.

La presente invención provee un método para producir un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano,

que comprende cultivar una célula hospedera que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, o un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, de tal manera que el ácido nucleico es expresado y el anticuerpo es producido. Preferiblemente el anticuerpo se aísla.

Como células hospederas, ácidos nucleicos y vectores se pueden usar los que se describen arriba. La expresión de los ácidos nucleicos se puede hacer, por ejemplo, mediante una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de gen como es muy conocido (véase por ejemplo Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202) y como se menciona arriba en la presente. Por ejemplo, para expresar los anticuerpos o fragmento de anticuerpo de los mismos, se pueden obtener ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa por medio de las técnicas estándares de biología molecular (por ejemplo amplificación de PCR o clonación de ADN usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés), y los ADN se pueden insertar en vectores tales como vectores de expresión. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen de modo que sean compatibles con la célula hospedera de expresión utilizada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante los métodos estándares (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios sobre el fragmento de gen de anticuerpo y el vector, o ligación de extremos rasurados si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada aquí descritas de los anticuerpos se pueden usar para crear genes de anticuerpo de longitud

GBX

completa de cualquier isotipo de anticuerpo, insertándolas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y regiones constantes de cadena ligera del isotipo deseado, de tal manera que el segmento VH se enlaza operativamente con los segmentos CH dentro del vector, y el segmento VK se enlaza operativamente con el segmento CL dentro del vector.

Caracterización y purificación de los anticuerpos anti-CD19

Los anticuerpos de la invención se pueden probar para determinar su unión al CD19 humano, por ejemplo por medio de ELISA estándar o mediante la unión a células de tumor de Raji. Los anticuerpos de la presente invención se pueden aislar o purificar en una variedad de formas conocidas para el experto en la materia. Los métodos de purificación estándares incluyen técnicas cromatográficas, incluso de intercambio iónico, interacción hidrofóbica, afinidad, filtración de tamaño o gel, y de fase inversa, efectuada a presión atmosférica o a presión alta utilizando sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, precipitación, diálisis y enfoque cromatográfico. También son útiles las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, en conjunto con concentración de la proteína. Para purificar los anticuerpos anti-CD19, se pueden desarrollar células hospederas seleccionadas, por ejemplo en matraces agitados, para la purificación del anticuerpo monoclonal, los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de una cromatografía de afinidad con Protein A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey). La IgG eluida se puede verificar por electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alto rendimiento para asegurar su pureza.

46

Inmunosconjugados

En otro aspecto, la presente invención provee un anticuerpo anti-CD19 humanizado o un fragmento del mismo que se une al CD19 humano, enlazado a un agente terapéutico tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan aquí "inmunosconjugados". Los inmunosconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para la célula (por ejemplo, la mata). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, danorubicina, dihidroxiantracina diona, mitoxatrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo metotrexate, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo vincristina y vinblastina). Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden unir a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de los mismos. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliqueamicina está disponible comercialmente (Mylotarg®; American Home Products). Las citotoxinas se pueden enlazar con los anticuerpos de la

invención usando la tecnología de enlazador disponible. Los ejemplos de tipos enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuro y enlazadores que contiene péptido. Se puede escoger un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible de corte por pH bajo dentro del compartimiento lisosómico, o susceptible de rompimiento por proteasas, tales como las proteasas expresadas preferentemente en tejido de tumor, tales como catepsina (por ejemplo captesina B, C, D). Para una exposición más amplia de tipos de citotoxina, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3: 1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 247-264. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden enlazar con un isótopo radioactivo para generar agentes radiofarmacéuticos citotóxicos, denominados también radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radioactivos que se pueden conjugar con los anticuerpos para usarse diagnósticamente o terapéuticamente incluyen, sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰, y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados están establecidos en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles comercialmente, incluyendo Zevalin® (EDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención. Los inmunoconjugados de anticuerpo de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y la porción de fármaco no se considera limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo,

gX

la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que tiene una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina de difteria; una proteína
5 tal como un factor de necrosis de tumor o interferon [*gamma*]; o modificadores de la respuesta biológica tales como por ejemplo linfocinas, interleucina 1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina 6 ("IL-6"), factor estimulador de colonia de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonia de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

10 Las técnicas para enlazar dichos agentes terapéuticos con los anticuerpos son muy conocidas, véase por ejemplo Arnon *et al*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en "Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy", Reisfeld *et al*. (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al*, "Antibodies For Drug Delivery", en "Controlled
15 Drug Delivery" (2ª ed.), Robinson *et al*. (eds.), p. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en "Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications", Pinchera *et al*. (eds.), p. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer
20 Therapy", en "Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy", Baldwin *et al*. (eds.), p. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al*, *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

Composiciones farmacéuticas

25 En otro aspecto, la presente invención provee una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir un



anticuerpo o inmunoconjugado de la invención o una combinación de los mismos (por ejemplo dos o más diferentes). Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados) que se unen a diferentes epítopes sobre el
5 antígeno objetivo, o que tienen actividades complementarias. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en una terapia de combinación, esto es, combinación con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-CD19 de la presente invención combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o
10 inmunosupresor.

Como se usa aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, etc., que sean fisiológicamente compatibles.
15 Preferiblemente el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, esto es, el anticuerpo o inmunoconjugado, se puede recubrir en un material para protegerlo de la acción de los ácidos y otras condiciones
20 naturales que pueden desactivar el compuesto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido. Se contempla el uso
25 de cualquier medio o agente convencional en las composiciones farmacéuticas de la invención, siempre que no sea incompatible con el compuesto activo. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

En otro aspecto, la presente invención provee una composición que comprende un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, enlazado con un agente terapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los
5 inmunoconjugados y agentes terapéuticos que se pueden usar son como se describe más arriba.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes
10 solubles en agua tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, etc., (2) antioxidantes solubles en aceite tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, etcétera; y (3) agentes quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido
15 etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, etc. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, etcétera), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales como aceite de oliva y
20 ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y utilizando agentes tensoactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservadores, agentes de mojado,
25 agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto por medio de los procedimientos de esterilización arriba mencionados, como por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno,

clorobutanol, fenol, ácido sórbico, etc. También puede ser conveniente incluir en las composiciones agentes isotónicos como azúcares, cloruro de sodio, etc. Además, la forma farmacéutica inyectable se puede hacer de absorción prolongada mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Usos terapéuticos y otros usos

Los anticuerpos humanizados de la presente invención tienen mucha utilidad diagnóstica y terapéutica *in vitro* e *in vivo*, que incluye el diagnóstico y tratamiento de trastornos mediados por CD19. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de trastornos mediados por CD19. Los sujetos preferidos son humanos e incluyen pacientes que tienen trastornos mediados por la actividad de CD19 (trastornos mediados por CD19). Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno mediado por CD19 asociado con poblaciones aberrantes de células B.

Un "paciente", para los fines de la presente invención, incluye tanto humanos como otros animales, preferiblemente mamíferos, muy de preferencia humanos. Así, los anticuerpos de la presente invención tienen aplicaciones terapéuticas tanto humanas como veterinarias. El término "tratamiento" en la presente invención incluye tratamiento terapéutico y también medidas profilácticas o supresoras de una enfermedad o trastorno. Así, por ejemplo, la administración exitosa de un anticuerpo antes del inicio de la enfermedad da como resultado el tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración exitosa de un anticuerpo después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. El "tratamiento"

también abarca la administración de un anticuerpo después de la aparición de la enfermedad para erradicar la enfermedad. La administración exitosa de un anticuerpo después del inicio y después de que se han desarrollado síntomas clínicos, con posible abatimiento de los síntomas clínicos y quizá el alivio de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos “en
5 necesidad de tratamiento” incluyen los mamíferos que ya tienen la enfermedad o trastorno, así como también aquellos susceptibles de tener la enfermedad o trastorno, incluso en los que se busca prevenir la enfermedad o trastorno.

10 En una modalidad particular, los anticuerpos humanizados se usan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de enfermedades mediadas por CD19. Así, la invención provee un método para el tratamiento de un trastorno mediado por CD19 en un sujeto, el método comprendiendo administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del
15 anticuerpo humanizado o fragmento del mismo. Los trastornos mediados por CD19 ejemplares incluyen trastorno autoinmune que incluye artritis reumatoide, cáncer, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de célula pilosa, linfomas de Burkitt, linfomas anaplásicos de célula grande (ALCL), linfomas cutáneos de
20 células T, linfomas nodulares de células pequeñas hendidas, linfomas de células T periféricas, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfoma de células T (ATLL), leucemia de células T del adulto (T-ALL), linfomas foliculares centroblasticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas difusos de células grandes de linaje B, linfoma de células T de tipo
25 linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfomas basados en cavidades corporales asociados con VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas no diferenciados de la rinofaringe (por ejemplo, el tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple,

02

macroglobulinemia de Waldenstrom, cáncer de células B resistente al anticuerpo anti-CD20, y otros linfomas de células B y leucemias. El cáncer de células B resistente al anticuerpo anti-CD20 es por ejemplo el cáncer de células B resistente a rituximab (Rituxan®), que es el cáncer preferido de células B resistente al anticuerpo anti-CD20. El cáncer preferido es el cáncer hematológico, especialmente cáncer relacionado con linfomas y leucemias que expresan CD19, en particular linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia de células pilosas. Los trastornos preferidos mediados por CD19 para ser tratados con el anticuerpo de la invención se seleccionan del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE) y cáncer de células B resistente al anticuerpo anti-CD20. Los trastornos mediados por CD19 preferidos para ser tratados con el anticuerpo de la invención son la artritis reumatoide, linfoma no Hodgkin o cáncer de células B resistente al anticuerpo anti-CD20.

Los "trastornos autoinmunes" incluyen rechazo de injerto de isleta alogénico, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, autoanticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (ANCA), enfermedades autoinmunes de la glándula adrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, miocarditis autoinmune, neutropenia autoinmune, ooforitis autoinmune y orquitis, trombocitopenia autoinmune, urticaria autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, síndrome de Castleman, dermatitis de enfermedad celiaca, síndrome de disfunción inmune de fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatrizante, síndrome de CREST, enfermedad por aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, lupus discoide,



crioglobulinemia mixta esencial, deficiencia del factor VIII, fibromialgia-fibriomiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, síndrome de Guillan-Barre, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD), tiroiditis de Hashimoto, hemofilia A, fibrosis pulmonar idiopática,

5 púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía de IgA, polineuropatías de IgM, trombocitopenia mediada por inmunidad, artritis juvenil, enfermedad de Kawasaki, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conectivo mixta, esclerosis múltiple (MS), diabetes mellitus de tipo 1, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa,

10 poliarteritis nudosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriática, fenómeno de Reynauld, síndrome de Reiter, artritis reumatoide (RA), sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, rechazo de transplante de órgano sólido, síndrome de la

15 persona rígida, lupus eritematoso sistémico (SLE), arteritis de Takayasu, arteritis temporal /arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica trombótica, colitis ulcerativa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme, vasculitis, vitiligo, vasculitis asociada con anticuerpo citoplásmico anti-neutrófilo, enfermedad de injerto contra hospedero,

20 crioglobulinemia, neuropatía mediada por IgM, neuromielitis óptica, nefropatía membranosa idiopática, opsoclonia-mioclónia, y granulomatosis de Wener.

Además, dada la expresión de CD19 sobre varias células de tumor, y dado el hecho de que el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la presente invención inhibe la proliferación de células B malignas

25 que expresan CD19 como se menciona arriba, la enfermedad mediada por CD19 es preferiblemente un trastorno tumorigénico como el cáncer, por ejemplo un trastorno caracterizado por la presencia de células de tumor que expresan CD19, que incluyen por ejemplo el linfoma no Hodgkin (NHL),

94

leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de Burkitt de leucemia de células pilosas, linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL), mieloma múltiple, linfomas cutáneos de células T, linfomas nodulares de células pequeñas hendidas, linfomas linfocíticos, linfomas de células T periféricas, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfoma de células T (ATLL), leucemia de células T del adulto (T-ALL), linfomas foliculares centroblásticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas difusos de células grandes de linaje B, linfoma de células T de tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfomas basados en cavidades corporales asociados con VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas no diferenciados de la rinofaringe (por ejemplo, el tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, cáncer de células B resistente al anticuerpo anti-CD20, y otros linfomas de células B y leucemias.

Así, en un aspecto adicional, la presente invención provee un método para inhibir el crecimiento de células de tumor que expresan CD19, que comprende poner en contacto las células con el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la invención, en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las células de tumor. Las células de tumor normalmente se seleccionan de células de linfoma Burkitt humanas, células de leucemia precursoras de células B humanas, células de leucemia de células B humanas o células de linfoma de células B humanas, preferiblemente células de linfoma de Burkitt o células de linfoma de células B humanas.

Dado el hecho de que el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la presente invención causa agotamiento de las células B de la sangre, la presente invención también provee un método para agotar las células B de un sujeto, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la invención en una cantidad eficaz

para agotar las células B del sujeto.

En una modalidad, los anticuerpos de la invención se pueden usar para detectar la cantidad de CD19, o la cantidad de células que contienen CD19 sobre la superficie de su membrana, dichas cantidades se pueden asociar entonces con ciertos síntomas de la enfermedad. Alternativamente, los anticuerpos se pueden usar para inhibir o bloquear la función de CD19, que a su vez se puede asociar con la prevención o alivio de ciertos síntomas de la enfermedad, implicando con ello a CD19 como un mediador de la enfermedad. Esto se puede hacer poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-CD19 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD19. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y CD19 se detecta y se compara en la muestra y el control. A la luz de la unión específica de los anticuerpos de la invención a CD19, los anticuerpos de la invención se pueden usar para detectar específicamente la expresión de CD19 sobre la superficie de las células, y además se pueden usar para purificar CD19 por medio de purificación de inmunoafinidad.

En otra modalidad, los anticuerpos de la invención se pueden probar inicialmente para determinar la actividad de unión asociada con el uso terapéutico o diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención se pueden probar usando las pruebas de citometría de flujo que se describen en la sección de ejemplos más abajo.

Además, la presente revelación provee el uso de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo como un medicamento, y el uso de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por CD19. En una modalidad adicional, la presente revelación provee el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usarse como un medicamento. La presente

96

revelación también provee el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usarse en un método para el tratamiento de un trastorno mediado por CD19. Los trastornos mediados por CD19 son los que se describen arriba.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-CD19 humanos de la invención se pueden administrar conjuntamente con uno o más de otros agentes terapéuticos, por ejemplo un agente citotóxico, un agente radiotóxico, o un agente inmunosupresor. El anticuerpo se puede unir al agente (como un complejo inmune) o se puede administrar separadamente del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después, o concurrentemente con el agente, o se puede administrar conjuntamente con otras terapias conocidas, por ejemplo una terapia anticancerosa, por ejemplo radiación.

Para la administración del anticuerpo, las dosis varían de aproximadamente 0.0001 mg/kg a 100 mg/kg, mas usualmente de 0.01 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del hospedero. Un régimen de tratamiento ejemplar abarca la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada tres meses, o una vez cada tres a seis meses. Usualmente el anticuerpo se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser por ejemplo semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares según indique la medición de los niveles sanguíneos del anticuerpo para el antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para obtener una concentración plasmática de anticuerpo de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml. Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo

A

de la vida media del anticuerpo en el paciente. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de su vida. En aplicaciones terapéuticas algunas veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina el avance de la enfermedad. Las dosis reales de los ingredientes activos, esto es, el anticuerpo de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, pueden variar a fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para obtener la respuesta terapéutica deseada en un paciente particular, para una composición y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. La dosis seleccionada dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares utilizadas de la presente invención, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del anticuerpo particular utilizado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos o materiales usados en combinación con las composiciones particulares usadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente tratado, y factores similares muy conocidos en las ciencias médicas.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-CD19 de la invención resulta preferiblemente en una reducción de la severidad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los periodos libres de la enfermedad o los síntomas, o una prevención del deterioro o incapacidad debida a la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de un trastorno tumorigénico (tumores CD19<+>), una "cantidad terapéuticamente eficaz" preferiblemente inhibe el crecimiento

af

celular o el crecimiento de tumor en al menos aproximadamente 20%, de preferencia por lo menos aproximadamente 40%, de preferencia por lo menos aproximadamente 60%, y muy de preferencia por lo menos aproximadamente 80%, con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento de un tumor se puede evaluar en un sistema de modelo animal profético de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede ser evaluada examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, dicha inhibición se puede medir *in vitro* mediante las pruebas conocidas para el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño del tumor o mejorar de otra manera los síntomas en un sujeto. El experto en la materia será capaz de determinar dichas cantidades basándose en factores tales como la talla del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o vía de administración seleccionadas.

El anticuerpo o la composición de la presente invención se pueden administrar por medio de una o más vías de administración usando uno o más métodos de una variedad de métodos conocidos. Como apreciará el experto en la materia, la vía o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal y otras vías de administración parenterales, por ejemplo por inyección o infusión. Las vías de administración más preferidas son la intravenosa o subcutánea. La frase "administración parenteral", como se usa aquí, significa los modos de administración diferentes de la administración enteral o tópica, usualmente por inyección, e incluye sin inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular,

intrarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural o intraesternal. Alternativamente, un anticuerpo de la invención se puede administrar mediante una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, 5 sublingual o tópica.

Artículos de fabricación y kits

En otra modalidad de la revelación, se provee un artículo de fabricación que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, 10 la composición o el inmunoconjugado de la invención, para el tratamiento de un trastorno mediado por CD19. El artículo de fabricación puede comprender un envase y una etiqueta o inserto de envase sobre o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen por ejemplo botellas, frascos o jeringas. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales 15 tales como vidrio o plástico. El recipiente retiene una composición que puede ser eficaz para tratar la condición y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo de la composición puede ser el anticuerpo 20 humanizado descrito en la presente. La etiqueta o inserto de envase puede indicar que la composición se puede usar para tratar la afección de elección, tal como el cáncer. En una modalidad, la etiqueta o inserto de envase puede indicar que la composición que comprende el anticuerpo humanizado se puede usar para tratar un trastorno mediado por CD19.

25 Además, el artículo de fabricación puede comprender: (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende el anticuerpo humanizado de la presente, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la



composición comprende un agente terapéutico diferente del anticuerpo humanizado. El artículo de fabricación en esta modalidad de la revelación puede comprender además un inserto de envase que indica que la primera y segunda composición se pueden usar en combinación para tratar una enfermedad o trastorno mediado por CD19. Tal agente terapéutico puede ser cualquiera de las terapias auxiliares descritas en la sección precedente (por ejemplo, un agente trombolítico, un agente antiplaquetario, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un compuesto antihormonal, un cardioprotector, o un regulador de la función inmune en un mamífero, incluso una citocina). Alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender un segundo (o tercer) recipiente que comprende una solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección bacteriostática (BWF), solución salina amortiguadora de fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales convenientes desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros amortiguadores, diluentes, filtros, agujas y jeringas.

También se incluyen dentro del alcance de la presente invención kits que comprenden el anticuerpo, las composiciones o los inmunoconjugados de la invención, e instrucciones para usarse. Además, el kit puede contener uno o más reactivos adicionales tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos humanizados adicionales de la invención (por ejemplo un anticuerpo humanizado que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno CD19 distinto del primer anticuerpo humanizado).

25

Depósito de material

Los siguientes materiales se depositaron en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstr.

101

7 B, 38124 Braunschweig, Alemania: el microorganismo (*E. coli*) depositado en el DSMZ el 5 de febrero de 2010, que tiene el No. de registro DSM 23303, que comprende ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de la variante FMC63 humanizada que se une al CD19 humano como se describe en el ejemplo 1. El microorganismo (*E. coli*) depositado en el DSMZ el 5 de febrero de 2010, que tiene el No. de registro DSM 23302, que comprende ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de la variante FMC63 humanizada que se une al CD19 humano como se describe en el ejemplo 1. Estos depósitos se hicieron bajo las provisiones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines de Procedimientos de Patentes, y las Regulaciones del mismo (tratado de Budapest).

Sin mayor descripción, se cree que el experto en la materia, usando la descripción precedente y los ejemplos ilustrativos subsiguientes, puede hacer y utilizar los agentes de la presente revelación y practicar los métodos reclamados. Los siguientes ejemplos de trabajo se proveen para facilitar la práctica de la presente revelación y no están considerados en modo alguno como limitativos del resto de la revelación.

102

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Humanización del anticuerpo monoclonal FMC63 de ratón contra CD19

5

humano

En la presente se describe la humanización del anticuerpo FMC63 murino anti-CD19 humano, que incluye la selección de armazones aceptoras humanas, retromutaciones y mutaciones que retienen

10 sustancialmente o mejoran las propiedades de unión de los armazones aceptores injertados con CDR humanas. El FMC63 es un anticuerpo *kappa* de IgG2a murina, aislado de ratones inmunizados con la línea de células de leucemia prolinfocítica humana JVM3 (Zola H. *et al* (1991), *Immunol Cell Biol.*, 69:411-22.), y para la cual las regiones variables se conocen y están

15 públicamente disponibles (cadena pesada, No. de registro NCBI CAA74659 (SEQ ID NO: 1); cadena ligera No. de registro NCBI CAA74660 (SEQ ID NO: 2)). Los métodos para probar la afinidad de unión con el antígeno son muy conocidos e incluyen pruebas de unión media-máxima, pruebas de competencia y análisis de gráficas de Scatchard.

Diseño de las regiones variables reformadas

Selección de armazones aceptores humanos: Se usó coincidencia de homología para escoger armazones aceptores humanos para injertar CDR de FMC63. Se pueden usar bases de datos (por ejemplo una

5 base de datos de genes variables de línea germinal de los locus de inmunoglobulina de humano y ratón, VBASE2 (Retter I. *et al*, 2005, *Nucleic Acids Res.*, 33, edición de base de datos D671-D674), o la base de datos de Kabat (Johnson G. *et al*, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28, p. 214-218)), o publicaciones (por ejemplo Kabat *et al*, "Sequences of Proteins of

10 Immunological Interest", 1992) para identificar las subfamilias humanas a las cuales pertenecen las regiones V de cadena pesada y ligera murinas, y para determinar el armazón de línea germinal humana más adecuado para usarse como la molécula aceptora. La selección de secuencias VH y VL dentro de estas subfamilias que se van a utilizar como aceptoras se puede basar en

15 homología de secuencia o una coincidencia de estructura de las regiones CDR1 y CDR2 para ayudar a conservar la presentación relativa adecuada de las seis CDR después del injerto.

Por ejemplo, el uso de la base de datos VBASE2 indica que la cadena ligera *kappa* de FMC63 es de una de las subfamilias *kappa*, dado que

20 se identificó buena homología entre el armazón de VL de FMC63 y los miembros de la subfamilia *kappa* I de humano. La homología e identidad más altas tanto de las CDR como de las secuencias de armazón se observan para cuatro secuencias de línea germinal: IGKV1-5*03 (VBASE2 ID humIGKV087) (SEQ ID NO:3), IGKV1-27*01 (VBASE2 ID humIGKV106) (SEQ ID NO:4),

25 IGKV1-39*01 (VBASE2 ID humIGKV115) (SEQ ID NO:5) e IGKV1-12*01 (VBASE2 ID humIGKV094) (SEQ ID NO:6), que tienen una identidad de secuencia de 70.4%, 75%, 76.1% y 72.7%, respectivamente, para la secuencia completa hasta la CDR3 y una identidad de secuencia de 74.3%,

1954

78.6% 78.6% y 77.1%, respectivamente, para regiones de armazón. Puesto que las 4 regiones completas de Lcdr3 y armazón no están incluidas en VBASE2, las secuencias de segmento JK de mejor coincidencia para el armazón aceptor humano se identificaron por medio de análisis de ADN complementario (ADNc) preparado de ARNm de células B de donador sano, que subsiguientemente se amplificaron usando un iniciador degenerado y primer dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina, partiendo del isotipo *kappa* mostrado en el cuadro 1. Usando esta propuesta, las secuencias de mejor coincidencia de las amplificaciones fueron: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para IGKV1-5*03 (SEQ ID NO: 3), IGKV1-27*01 (SEQ ID NO: 4), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 5) e IGKV1-12*01 (SEQ ID NO: 6), respectivamente.

103

CUADRO 1

5

Secuencia de iniciador directo (5'→3')	Secuencia de iniciador inverso (5'→3')
GATCGGATCCACTGGTGATATTGTGATG ACYCAGWCTCC (SEQ ID NO: 70)	GATCGCGGCCGCACACTCTCCCCTGTTG AAGCTCTT (SEQ ID NO: 71)

10

Región variable de línea germinal	Región variable amplificada
Hum IGKV 087 (SEQ ID NO: 3)	pAE18 VL-2a clon#39 (SEQ ID NO: 7)
Hum IGKV 106 (SEQ ID NO: 4)	pAE18 VL-2a clon#40 (SEQ ID NO: 8)
Hum IGKV 115 (SEQ ID NO: 5)	pAE18 VL-2a clon#43 (SEQ ID NO: 9)
Hum IGKV 094 (SEQ ID NO: 6)	pAE18 VL-2a clon#44 (SEQ ID NO: 10)

15

20

25

Similarmente, el uso de VBASE2 indica que la secuencia VH de FMC63 hasta el armazón, tres entran en la subfamilia VH III humana. Dentro de la subfamilia VH III humana, FMC63 muestra la homología de secuencia más alta con IGHV3-33*01 (VBASE2-ID: humIGHV199) (SEQ ID NO: 11), IGHV3-11*01 (VBASE2-ID: humIGHV175) (SEQ ID NO: 12), IGHV3-30*18 (VBASE2-ID: humIGHV195) (SEQ ID NO: 13) e IGHV3-48*01 (VBASE2-ID: humIGHV031) (SEQ ID NO: 14), que presentan homología de secuencia arriba de 70.4% para las regiones de armazón y CDR. En cuanto a la cadena ligera, una fuente para identificar segmentos JH compatibles es el ADNc preparado del ARNm de células B de donadores sanos, amplificado con iniciadores degenerados y el primer dominio constante de cadena pesada de IgM (cuadro 2). Las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 fueron más cercanas a IGHV3-33*01 (VBASE2-ID: humIGHV199) (SEQ ID NO: 11), IGHV3-11*01 (VBASE2-ID:

humIGHV175) (SEQ ID NO: 12), IGHV3-30*03 (VBASE2-ID: humIGHV195)
(SEQ ID NO: 13) e IGHV3-48*01 (VBASE2-ID: humIGHV031) (SEQ ID NO:
14), respectivamente.

104

CUADRO 2

5

Secuencia de iniciador directo (5'→3')	Secuencia de iniciador inverso (5'→3')
GATCGGATCCACTGGTGAGGTGCAGCTGGT GGAGTC (SEQ ID NO: 72)	GATCGCGGCCGCTGGAAGAGGCACGTTT TTTTCTTT (SEQ ID NO: 73)
GATCGGATCCACTGGTCAGGTYCAGCTKGT GCAGTCTGG (SEQ ID NO: 113)	

10

Región variable de línea germinal	Iniciadores	Región variable amplificada
Hum IGHV 199 (SEQ ID NO: 11)	SEQ ID NO: 72 SEQ ID NO: 73	pAE18 VH-3a clon#2 (SEQ ID NO: 15)
Hum IGHV 175 (SEQ ID NO: 12)	SEQ ID NO: 72 SEQ ID NO: 73	pAE18 VH-3a clon#5 (SEQ ID NO: 16)
Hum IGHV 195 (SEQ ID NO: 13)	SEQ ID NO: 113 SEQ ID NO: 73	pAE18 VH-1b clon#16 (SEQ ID NO: 17)
Hum IGHV 031 (SEQ ID NO: 14)	SEQ ID NO: 113 SEQ ID NO: 73	pAE18 VH-1b clon#20 (SEQ ID NO: 18)

15

Preparación de las regiones variables humanas iniciales
inertadas con CDR

Los fragmentos VH y VL humanos preparados como se describe
arriba se usaron para iniciar el proceso de humanización. Se usaron ADNc
como moldes para el injerto de CDR usando ensamble de PCR de traslapo
para proveer los primeros candidatos humanizados basados en las siguientes
cadenas pesadas y ligeras: VH2 (SEQ ID NO: 19), VH5 (SEQ ID NO: 20),
VH16 (SEQ ID NO: 21), VH20 (SEQ ID NO: 22), VL39 (SEQ ID NO: 23), VL40
(SEQ ID NO: 24), VL43 (SEQ ID NO: 25) y VL44 (SEQ ID NO: 26), en las que
las CDR originales se reemplazaron con las CDR de FMC63 mostradas en el
cuadro 3.

104

CUADRO 3

Regiones CDR de FMC63

		Cadena pesada		Cadena ligera	
		Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	CDR1	GVSLPDYGVS	27	RASQDISKYLN	30
	CDR2	VIWGSETTYNSALKS	28	HTSRLHS	31
	CDR3	HYYYGGSYAMDY	29	QQGNTLPYT	32

Las cadenas pesadas VH2, VH5, VH16 y VH20 estaban basadas en ADNc que codifica los SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente, con CDR intercambiadas por CDR de FMC63 usando una estrategia de PCR de ensamble de cuatro fragmentos como se describe en los cuadros 4 y 5. Se usó una estrategia similar para VL39, VL40, VL43 y VL44 como se muestra en los cuadros 6 y 7. Para cadenas pesadas, los productos de las amplificaciones de PCR descritos en el cuadro 4 se subclonaron corriendo una PCR secundaria usando iniciadores adaptadores (iniciador de sentido HindIII VJ2C (SEQ ID NO: 93); e iniciador de antisentido, adaptador Sall (SEQ ID NO: 92)), para anexar un sitio Sall en el extremo 3' del ADNc de dominio variable (véase más abajo). Las amplificaciones descritas en el cuadro 6 permiten la clonación directa de cadenas *kappa* en un vector de expresión de células de mamífero (que se describe más abajo). En este caso, los productos contenían dominio *kappa* variable y también constante de longitud completa, y se clonaron en un vector de expresión de célula de mamífero usando una estrategia de sitios BamHI y NotI.

109

CUADRO 4

Resumen de moldes e iniciadores usados para construir las primeras regiones variables de cadena pesada injertadas con CDR

5

10

15

20

Construcción	Molde	Iniciadores de PCR Fragmento 1	Iniciadores de PCR Fragmento 2	Iniciadores de PCR Fragmento 3	Iniciadores de PCR Fragmento 4
VH2/FMC63 injertado (SEQ ID NO: 19)	pAE18 VH-3a clon #2 (SEQ ID NO: 15)	Directo CMV-IE (SEQ ID NO: 74) e Inverso enlazador VH2 mCDR1 (SEQ ID NO: 76)	Directo enlazador VH2 mCDR1 (SEQ ID NO: 77) e Inverso enlazador VH2 mCDR2 (SEQ ID NO: 78)	Directo enlazador VH2 mCDR2 (SEQ ID NO: 79) e Inverso enlazador VH2 mCDR3 (SEQ ID NO: 80)	Directo enlazador VH2 mCDR3 (SEQ ID NO: 81) e Inverso BGH (SEQ ID NO: 75)
VH5/FMC63 injertado (SEQ ID NO: 20)	pAE18 VH-3a clon #5 (SEQ ID NO: 16)	Directo CMV-IE (SEQ ID NO: 74) e Inverso enlazador VH5 mCDR1 (SEQ ID NO: 82)	Directo enlazador VH5 mCDR1 (SEQ ID NO: 83) e Inverso enlazador VH20 mCDR2 (SEQ ID NO: 89)	Directo enlazador VH5 mCDR2 (SEQ ID NO: 84) e Inverso enlazador VH5 mCDR3 (SEQ ID NO: 85)	Directo enlazador VH5 mCDR3 (SEQ ID NO: 86) e Inverso BGH (SEQ ID NO: 75)
VH16/FMC63 injertado (SEQ ID NO: 21)	pAE18 VH-1b clon #16 (SEQ ID NO: 17)	Directo CMV-IE (SEQ ID NO: 74) e Inverso enlazador VH5 mCDR1 (SEQ ID NO: 82)	Directo enlazador VH2 mCDR1 (SEQ ID NO: 77) e Inverso enlazador VH2 mCDR2 (SEQ ID NO: 78)	Directo Enlazador VH2 mCDR2 (SEQ ID NO: 79) e Inverso enlazador VH16 mCDR3 (SEQ ID NO: 87)	Directo enlazador VH2 mCDR3 (SEQ ID NO: 81) e Inverso BGH (SEQ ID NO: 75)
VH20/FMC63 injertado (SEQ ID NO: 22)	pAE18 VH-1b clon #20 (SEQ ID NO: 18)	Directo CMV-IE (SEQ ID NO: 74) e Inverso enlazador VH20 mCDR1 (SEQ ID NO: 88)	Directo enlazador VH2 mCDR1 (SEQ ID NO: 77) e Inverso enlazador VH20 mCDR2 (SEQ ID NO: 89)	Directo enlazador VH20 mCDR2 (SEQ ID NO: 90) e Inverso enlazador VH20 mCDR3 (SEQ ID NO: 91)	Directo enlazador VH2 mCDR3 (SEQ ID NO: 81) e Inverso BGH (SEQ ID NO: 75)

110

CUADRO 5

Secuencias de iniciadores usados para construir las primeras regiones variables seleccionadas de cadena pesada humana injertadas con CDR

5

10

15

20

Iniciador	Secuencia (5'→3')
Directo CMV-IE (SEQ ID NO: 74)	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
Inverso BGH (SEQ ID NO: 75)	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
Inverso Enlazador VH2 mCDR1 (SEQ ID NO: 76)	GCT CAC GCC GTA GTC GGG CAG GCT CAC GCC AGA CGC TGC ACA GGA GAG TCT C
Directo Enlazador VH2 mCDR1 (SEQ ID NO: 77)	GGC GTG AGC CTG CCC GAC TAC GGC GTG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GG
Inverso Enlazador VH2 mCDR2 (SEQ ID NO: 78)	GGC GCT GTT GTA GTA GGT TGT CTC GGA GCC CCA GAT CAC TGC CAC CCA CTC CAG CCC CTT G
Directo Enlazador VH2 mCDR2 (SEQ ID NO: 79)	GGC TCC GAG ACA ACC TAC TAC AAC AGC GCC CTG AAG AGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC
Inverso Enlazador VH2 mCDR3 (SEQ ID NO: 80)	CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG TGT GGT ACA GTA ATA CAC GGC
Directo Enlazador VH2 mCDR3 (SEQ ID NO: 81)	CAC TAC TAC TAC GGC GGC AGC TAC GCC ATG GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG
Inverso Enlazador VH5 mCDR1 (SEQ ID NO: 82)	GCT CAC GCC GTA GTC GGG CAG GCT CAC GCC AGA GGC TGC ACA GGA GAG TCT C
Directo Enlazador VH5 mCDR1 (SEQ ID NO: 83)	GGC GTG AGC CTG CCC GAC TAC GGC GTG AGC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG
Directo Enlazador VH5 mCDR2 (SEQ ID NO: 84)	GGC TCC GAG ACA ACC TAC TAC AAC AGC GCC CTG AAG AGC CGA TTC ACC ATC TCC AGG GAC AAC GCC
Inverso Enlazador VH5 mCDR3 (SEQ ID NO: 85)	GTA GTC CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG CCC CGC ACA GTA ATA AAC GGC
Directo Enlazador VH5 mCDR3 (SEQ ID NO: 86)	CAC TAC TAC TAC GGC GGC AGC TAC GCC ATG GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC
Inverso Enlazador VH16 mCDR3 (SEQ ID NO: 87)	CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG TCT CGC ACA GTA ATA CAC GGC

117

CUADRO 5 (Continuación)

5

10

Iniciador	Secuencia (5'→3')
Inverso Enlazador VH20 mCDR1 (SEQ ID NO: 88)	GCT CAC GCC GTA GTC GGG CAG GCT CAC GCC AGA GGC TAC ACA GGA GAG TCT C
Inverso Enlazador VH20 mCDR2 (SEQ ID NO: 89)	GGC GCT GTT GTA GTA GGT TGT CTC GGA GCC CCA GAT CAC TGA AAC CCA CTC CAG CCC CTT C
Directo Enlazador VH20 mCDR2 (SEQ ID NO: 90)	GGC TCC GAG ACA ACC TAC TAC AAC AGC GCC CTG AAG AGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC
Inverso Enlazador VH20 mCDR3 (SEQ ID NO: 91)	CAT GGC GTA GCT GCC GCC GTA GTA GTA GTG TCT CGC ACA GTA ATA CAC AGC
Adaptador SalI (SEQ ID NO: 92)	GATC GTCGAC GC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GG
Directo HindIII VJ2C (SEQ ID NO: 93)	GATCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTC

112

CUADRO 6

Resumen de moldes e iniciadores usados para construir las primeras regiones variables de cadena ligera injertadas con CDR

Construcción	Molde	Iniciadores de PCR Fragmento 1	Iniciadores de PCR Fragmento 2	Iniciadores de PCR Fragmento 3	Iniciadores de PCR Fragmento 4
VL39/FMC63 injertado (SEQ ID NO: 23)	pAE18 VL-2a clon #39 (SEQ ID NO: 7)	CMV-IE (SEQ ID NO: 74) e Inverso enlazador VL43 mCDR1 (SEQ ID NO: 101)	Directo enlazador VL43 mCDR1 (SEQ ID NO: 102) e Inverso enlazador VL43 mCDR2 (SEQ ID NO: 103)	Directo enlazador VL39 mCDR2 (SEQ ID NO: 94) e Inverso enlazador VL39 mCDR3 (SEQ ID NO: 95)	Directo enlazador VL39 mCDR3 (SEQ ID NO: 96) e Inverso NotI Kappa (SEQ ID NO: 112)
VL40/FMC63 injertado (SEQ ID NO: 24)	pAE18 VL-2a clon #40 (SEQ ID NO: 8)	CMV-IE (SEQ ID NO: 74) e Inverso enlazador VL43 mCDR1 (SEQ ID NO: 101)	Directo enlazador VL43 mCDR1 (SEQ ID NO: 102) e Inverso enlazador VL40 mCDR2 linker Reverse (SEQ ID NO: 97)	Directo enlazador VL40 mCDR2 (SEQ ID NO: 98) e Inverso enlazador VL40 mCDR3 (SEQ ID NO: 99)	Directo enlazador VL40 mCDR3 (SEQ ID NO: 100) e Inverso NotI Kappa (SEQ ID NO: 112)
VL43/FMC63 injertado (SEQ ID NO: 25)	pAE18 VL-2a clon #43 (SEQ ID NO: 9)	CMV-IE (SEQ ID NO: 74) e Inverso enlazador VL43 mCDR1 (SEQ ID NO: 101)	Directo enlazador VL43 mCDR1 (SEQ ID NO: 102) e Inverso enlazador VL43 mCDR2 (SEQ ID NO: 103)	Directo enlazador VL43 mCDR2 (SEQ ID NO: 104) e Inverso enlazador VL43 mCDR3 (SEQ ID NO: 105)	Directo enlazador VL43 mCDR3 (SEQ ID NO: 106) e Inverso NotI Kappa (SEQ ID NO: 112)
VL44/FMC63 injertado (SEQ ID NO: 26)	pAE18 VL-2a clon #44 (SEQ ID NO: 10)	CMV-IE (SEQ ID NO: 74) e Inverso enlazador VL44 mCDR1 (SEQ ID NO: 107)	Directo enlazador VL43 mCDR1 (SEQ ID NO: 102) e Inverso enlazador VL44 mCDR2 (SEQ ID NO: 108)	Directo enlazador VL44 mCDR2 (SEQ ID NO: 109) e Inverso enlazador VL44 mCDR3 (SEQ ID NO: 110)	Directo enlazador VL44 mCDR3 (SEQ ID NO: 111) e Inverso NotI Kappa (SEQ ID NO: 112)

113

CUADRO 7

Secuencias de iniciadores usados para construir las primeras regiones
variables seleccionadas de cadena ligera humana injertadas con CDR

	Iniciador	Secuencia (5'→3')
5	Directo enlazador VL39 mCDR2 (SEQ ID NO: 94)	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC
	Inverso enlazador VL39 mCDR3 (SEQ ID NO: 95)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG GCA GTA ATA AGT TGC AAA ATC ATC
	Directo enlazador VL39 mCDR3 (SEQ ID NO: 96)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG G
	Inverso enlazador VL40 mCDR2 (SEQ ID NO: 97)	GCT GTG CAG CCG GCT GGT GTG ATA GAT CAG GAG GTT AGG AAC
	Directo enlazador VL40 mCDR2 (SEQ ID NO: 98)	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCT CGG TTC AGC GGC
	Inverso enlazador VL40 mCDR3 (SEQ ID NO: 99)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG ACA GTA ATA AGT TGC AAA ATC TTC
10	Directo enlazador VL40 mCDR3 (SEQ ID NO: 100)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
	Inverso enlazador VL43 mCDR1 (SEQ ID NO: 101)	GTT CAG GTA CTT GCT GAT GTC CTG GCT GGC CCG GCA AGT GAT GGT GAC TCT GTC TCC
	Directo enlazador VL43 mCDR1 (SEQ ID NO: 102)	CGG GCC AGC CAG GAC ATC AGC AAG TAC CTG AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG
	Inverso enlazador VL43 mCDR2 (SEQ ID NO: 103)	GCT GTG CAG CCG GCT GGT GTG ATA GAT CAG GAG CTT AGG GGC
	Directo enlazador VL43 mCDR2 (SEQ ID NO: 104)	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC
	Inverso enlazador VL43 mCDR3 (SEQ ID NO: 105)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG ACA GTA GTA AGT TGC AAA ATC TTC
15	Directo enlazador VL43 mCDR3 (SEQ ID NO: 106)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG G
	Inverso enlazador VL44 mCDR1 (SEQ ID NO: 107)	GTT CAG GTA CTT GCT GAT GTC CTG GCT GGC CCG ACA AGT GAT GGT GAC TCT GTC TCC
	Inverso enlazador VL44 mCDR2 (SEQ ID NO: 108)	GCT GTG CAG CCG GCT GGT GTG ATA GAT CAG GAG GTT AGG GGC
	Directo enlazador VL44 mCDR2 (SEQ ID NO: 109)	CAC ACC AGC CGG CTG CAC AGC GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC
	Inverso enlazador VL44 mCDR3 (SEQ ID NO: 110)	GGT GTA GGG CAG TGT GTT GCC TTG CTG ACA ATA ATA AGT TGC AAA ATC TTC
20	Directo enlazador VL44 mCDR3 (SEQ ID NO: 111)	CAG CAA GGC AAC ACA CTG CCC TAC ACC TTT GGC CAG GGG ACC AAG TTG G
	Inverso NotI Kappa (SEQ ID NO: 112)	GATC GCGGCCGC TTA TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC

11/18

Las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras construidas por ingeniería se ligaron en vectores independientes que están basados en un vector pREP4 modificado (Invitrogen, California, EE. UU.) que lleva el promotor CMV y una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El vector específico de la cadena ligera permite la expresión de cadenas ligeras del isotipo *kappa* ligando fragmentos de ADNc de cadena ligera variable *kappa* enfrente de ADNc del dominio constante de cadena ligera *kappa* usando los sitios de restricción BamHI y BsiWI; entretanto se construyó por ingeniería un vector específico de cadena pesada para ligar fragmentos de ADNc de cadena pesada variable enfrente de un ADNc que codifica los dominios constantes $\gamma 1$, gozne, $\gamma 2$ y $\gamma 3$ usando los sitios de restricción BamHI y Sall. En los dos vectores de expresión de cadena pesada y ligera, el péptido guía VJ2C que contiene el sitio BamHI impulsó la secreción. Es de notar que el sitio BsiWI está localizado en el dominio constante *kappa*, mientras que el sitio Sall está situado en el dominio Cy1.

Para la expresión transitoria de candidatos de inmunoglobulina, cantidades iguales de vectores de las cadenas pesada y ligera se cotransfectaron en células HEK-EBNA adaptadas en suspensión (ATCC-CRL-10852) usando polietilenimina (PEI). Normalmente se transfectan 100 ml de células en suspensión a una densidad de 0.8-1.2 millones de células por ml con una mezcla ADN-PEI que contiene 50 μ g de vector de expresión que codifica la cadena pesada y 50 μ g de vector de expresión que codifica la cadena ligera. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en las células hospederas, los anticuerpos se producen cultivando adicionalmente las células durante un periodo de 4 a 5 días para permitir la secreción hacia el medio de cultivo (medio libre de suero HEK293, EX-CELL 293, Sigma, Buchs, Suiza), suplementado con 0.1% de

1/2

ácido plurónico, 4 mM de glutamina y 0.25 µg/ml de geneticina). Después los anticuerpos se purificaron del sobrenadante libre de células usando un medio Protein-A Streamline recombinante (GE, Suiza), y se cambiaron de amortiguador a una solución salina amortiguadora de fosfato antes de las

5 pruebas.

La estrategia de humanización se basó en las cuatro cadenas pesadas y ligeras injertadas iniciales (véase arriba), que se combinaron en forma de pares para derivar 16 candidatos de inmunoglobulina iniciales de longitud completa. Estas inmunoglobulinas se evaluaron para determinar su

10 afinidad de unión con el antígeno por medio de pruebas de unión media-máxima en líneas de células de linfoma de células B (FACS), y se compararon con una versión quimérica de FMC63 (esto fue al grado de marcación estandarizado del anticuerpo de detección anti-Fc humano marcado con PE, como se describe en el ejemplo 2). De este trabajo inicial, los candidatos de

15 inmunoglobulina que contenían VH16 (SEQ ID NO: 21) o VH20 (SEQ ID NO: 22) mostraron la mejor unión a las células de Raji en los experimentos de FACS, como se observa en las figuras 1A y 1B. El anticuerpo que consiste en la cadena pesada VH16 apareada con la VL43 ligera tuvo un grado de expresión superior en las transfecciones transitorias y también una

20 temperatura de fusión superior de su fragmento FAB, y consecuentemente se seleccionó para más retromutaciones e ingeniería racional como se muestra en el cuadro 8.

1/16

CUADRO 8

Grado de expresión transitoria de IgG y estabilidad de FAB de los primeros anticuerpos injertados con CDR

Anticuerpo	Expresión (mg/l)	Tm Fab (°C)
FMC63 quimérico	48	84.27
VH2/VL39	11	78.78
VH2/VL40	23	76.55
VH2/VL43	13	73.17
VH2/VL44	21	78.27
VH5/VL39	5	76.08
VH5/VL40	9	ND
VH5/VL43	19	76.76
VH5/VL44	12	74.81
VH16/VL39	8	71.67
VH16/VL40	11	71.81
VH16/VL43	20	83.54
VH16/VL44	7	85.16
VH20/VL39	11	82.41
VH20/VL40	24	79.46
VH20/VL43	37	79.67
VH20/VL44	26	82.00

Retromutaciones de armazones humanas

Puesto que el injerto directo de las CDR del anticuerpo de ratón FMC63 conlleva a aceptores humanos con propiedades de unión baja, fue deseable mutar algunos residuos de los armazones de vuelta a los residuos murinos en algunas posiciones. Este proceso, llamado retromutación, es el procedimiento más impredecible en la humanización de los anticuerpos monoclonales y necesita la identificación de los residuos de armazón críticos del anticuerpo progenitor que es necesario retener para retener

152

sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo progenitor, al mismo tiempo minimizando la posible inmunogenicidad del anticuerpo resultante. Los cuadros 9 y 10 y las figuras 2A y 2B muestran los residuos (numeración de Kabat) que pueden afectar las conformaciones de las CDR y que se
5 seleccionaron como posibles candidatos para hacer las retromutaciones a los residuos murinos.

CUADRO 9

Comparación de FMC63 y armazones de cadena ligera aceptora humana

10

VH			
Posición de Kabat	FMC63	VH16	VH20
37	I	V	V
42	R	G	G
48	L	V	V
49	G	A	S
67	L	F	F
71	K	R	R
78	V	L	L
94	K	R	R

118

CUADRO 10

Comparación de FMC y armazones de cadena pesada aceptora humana

VL		
Posición de Kabat	FMC63	VL39,VL40,VL43,VL44
44	V	P,P,P,P
71	Y	F,F,F,F
87	F	Y,Y,Y,Y

5

Entre las ocho posibles retromutaciones para la cadena pesada, los cambios en las posiciones 37, 48 y 49 se desecharon debido a su naturaleza conservativa. Por lo tanto, se hicieron cuatro versiones reformadas de VH16 y se combinaron por pares con las tres retromutaciones de VL43. Además, las variantes reformadas se aparearon con VH16 y VL43 progenitores para investigar el impacto de cada retromutación individual. Se investigó un total de 24 candidatos de inmunoglobulina de longitud completa. Las cinco variantes de cadena pesada tenían la siguiente mutación de un solo punto en comparación con la secuencia de VH16: G42R, F67L, R71K, L78V y R94K; mientras que las tres variantes de cadena ligera tenían P44V, F71Y y Y87F en comparación con VL43.

De los experimentos de FACS (como se describe en el ejemplo 2), los niveles de expresión transitoria y las mediciones de estabilidad del FAB, se encontró que las retromutaciones de cadena pesada R94K o de cadena ligera P44V aumentan notablemente la unión a las células de Raji o células NALM-6, mejorando al mismo tiempo el grado de expresión y manteniendo buena estabilidad del FAB como se muestra en los cuadros 11 y 12. Estas dos posiciones solas restauraron casi la mitad de la unión del anticuerpo FMC63 progenitor.

20

25

119

CUADRO 11

Marcación en FACS de anticuerpos anti-CD19 retromutados humanizados, en líneas de células de tumor de Raji y NALM-6

5

	VL43		VL43-P44V		VL43-F71Y		VL43-Y87F	
	Raji	NALM-6	Raji	NALM-6	Raji	NALM-6	Raji	NALM-6
VH16	7.42	3.29	9.72	6.05	11.29	NA	10	NA
VH16-G42R	NA	3.48	8.33	NA	NA	3.97	8.43	3.65
VH16-F67L	NA	2.40	NA	2.37	6.54	NA	4.35	NA
VH16-R71K	4.43	NA	6.93	NA	NA	2.67	4.19	NA
VH16-L78V	10.77	NA	25.93	10.95	12.28	NA	17.95	NA
VH16-R94K	27.06	14.38	52.87	32.86	41.82	23.47	31.82	NA

10

Los valores (indicados como Raji y NALM-6 para las mediciones en células de Raji y NALM-6, respectivamente) corresponden a la fluorescencia de punto medio (MPF) de los anticuerpos medida por medio de citometría de flujo, expresada como porcentaje de la fluorescencia observada para el anticuerpo quimérico FMC63.

CUADRO 12

Grado de expresión transitoria de IgG y estabilidad del FAB de los anticuerpos anti-CD19 retromutados humanizados

20

	VL43		VL43-P44V		VL43-F71Y		VL43-Y87F	
	Tm FAB (°C)	Grado de expresión transitoria (mg/l)	Tm FAB (°C)	Grado de expresión transitoria (mg/l)	Tm FAB (°C)	Grado de expresión transitoria (mg/l)	Tm FAB (°C)	Grado de expresión transitoria (mg/l)
VH16	83.54	20	81.04	29	83.9	25	82.97	24
VH16-G42R	82.59	48	79.84	20	83.08	48	82.51	34
VH16-F67L	82.92	46	79.92	23	83.34	29	82.22	22
VH16-R71K	83.92	45	80.9	52	83.67	48	83.34	39
VH16-L78V	87.87	36	85.87	42	87.87	44	86.68	42
VH16-R94K	82.75	63	80.10	42	82.88	50	82.22	38

25

Líneas germinales

Los armazones de líneas germinales normalmente son mejores
 5 que el armazón del anticuerpo maduro individual como armazones aceptores
 para los anticuerpos humanizados, porque su falta de mutaciones somáticas
 puede reducir el grado de inmunogenicidad. El VH16 se deriva de ARNm de
 células B de donador sano usando iniciadores degenerados diseñados de
 acuerdo con las secuencias de línea germinal de VBASE2, y este
 10 procedimiento provee anticuerpos que todavía no han encontrado ningún
 antígeno. Sin embargo, puesto que la frecuencia de anticuerpos
 verdaderamente nativos depende enormemente de la fuente de células B,
 también se pueden observar mutaciones con el procedimiento arriba descrito
 (Klein U. *et al*, 1997, *Blood* 89, p. 1288-1298). Tanto VH16 como VL 43
 15 tuvieron un contenido bajo de residuos no germinales que fueron mutados de
 vuelta a la línea germinal, estos cambios fueron VH16-Q6E, VL43-V3Q y
 VL43-T7S, como se muestra en el cuadro 13.

CUADRO 13

20 Marcación en FACS de anticuerpos anti-CD19 humanizados
retromutados/modificados de línea germinal en líneas de células de
tumor de Raji. Los valores (indicados como Raji) corresponden a la
fluorescencia de punto medio (MPF) de los anticuerpos, medida por
medio de citometría de flujo, expresada como porcentaje de la
 25 fluorescencia observada para el anticuerpo quimérico FMC63. También
se indica el grado de expresión transitoria de IgG y la estabilidad del
FAB de los anticuerpos anti-CD19 humanizados
retromutados/modificados a la línea germinal

121

5

	VL43			VL43-V3Q / T7S		
	Raji	Grado de expresión transitoria (mg/l)	Tm FAB (°C)	Raji	Grado de expresión transitoria (mg/l)	Tm FAB (°C)
VH16	7.14	20	83.54	4.93	28	83.51
VH16-R94K	26.79	60	82.75	27.78	13.5	82.36
VH16-Q6E	ND	30	83.12	5.68	36	83.46

10

Se encontró que ninguno de los cambios de línea germinal tiene impacto sobre el anticuerpo VH16-VL43, ni sobre su afinidad ni sobre su estabilidad de FAB, y solo aumentaron significativamente el grado de expresión transitoria. Subsiguientemente, las variantes VH16-VL43 con residuos de línea germinal en la posición VL43-V3Q, y VL43-T7S se usaron para mejorar la afinidad por medio de diseño racional (véase más abajo).

15

Mejoramiento de la afinidad de aceptores humanos retromutados por medio de diseño racional e ingeniería de CDR

20

Mutantes de tirosina. Las CDR de FMC63 tienen un alto contenido de tirosina: CDR1 de cadena pesada (posición 32), CDR2 de cadena pesada (posiciones 58 y 59), CDR3 de cadena pesada (posiciones 96, 97, 98 y 100b), CDR1 de cadena ligera (posición 32) y CDR3 de cadena ligera (posición 96). En particular están los cuatro residuos de tirosina en la CDR3 de cadena pesada (Y96, Y97, Y98 y Y100b), y los otros dos residuos de tirosina encontrados en la CDR1 de cadena pesada y la CDR1 de cadena ligera, ambos en la posición 32. Estos residuos pueden definir el sitio de unión de interacción putativa para la molécula CD19 humana, puesto que además de su naturaleza hidrofóbica y el hecho de que la mayoría de ellos son parte de la CDR3 de cadena pesada, usualmente la CDR más importante ya que frecuentemente determina la especificidad, también sobresalen fuera del plan del sitio de unión del anticuerpo en el modelo 3D de VH16-

25

R94K/VL43. Estas observaciones tomadas en conjunto permiten la identificación de los residuos de CDR3 de cadena pesada 96, 97, 98, 100b, y el residuo 32 de la CDR1 de cadena ligera como los candidatos para el mejoramiento racional de la afinidad. Los residuos de tirosina son únicos porque tienen una naturaleza doble, hidrofóbica y polar, en virtud de su anillo aromático y un grupo hidroxilo, respectivamente. Por lo tanto, los residuos arriba mencionados se cambiaron a fenilalanina para aumentar la hidrofobicidad y sondear la importancia del contenido polar contra el hidrofóbico en estas posiciones. Las mediciones de los mutantes de fenilalanina en el contexto de las mutaciones R94K de cadena pesada muestran que el mutante 32, 97, 98 de cadena pesada y también el mutante 32 de cadena ligera, son superiores a la molécula progenitora VH16-R94K/VL43, el mutante Y97F de cadena pesada teniendo 72.8% de afinidad de FMC63 quimérico como se muestra en el cuadro 14.

123

CUADRO 14

Marcación en FACS de anticuerpos anti-CD19 humanizados
retromutados/de afinidad madurada en líneas de células de tumor de
Raji. Los valores (indicados como marcación relativa en la FACS de las
células de Raji) corresponden a la fluorescencia de punto medio (MPF)
de los anticuerpos, medida por medio de citometría de flujo, expresada
como porcentaje de la fluorescencia observada para el anticuerpo
quimérico FMC63. También se indica el grado de expresión transitoria
de IgG y la estabilidad del FAB de los anticuerpos anti-CD19
humanizados retromutados/de afinidad madurada

Anticuerpo	Marcación relativa en FACS de células de Raji	Expresión transitoria (mg/l)	Tm FAB (°C)
VH16 R94K Y32F VL43	62.5	17	82.51
VH16 R94K Y96F VL43	5.36	14	83.53
VH16 R94K Y97F VL43	72.82	17	81.53
VH16 R94K Y98F VL43	34.09	10	81.91
VH16 R94K Y100bF VL43	27.78	24	82.92
VH16 R94K VL43 Y32F	39.47	25	82.56

Mutantes Pro-44 de cadena ligera

La P44 de cadena ligera se localiza en el fondo de la interfaz entre la cadena pesada y ligera, una localización que podría explicar el gran mejoramiento de la afinidad cuando se hace la retromutación a valina. Se investigaron otros dos aminoácidos hidrofóbicos en la posición 44 para posiblemente afinar (o ajustar mejor) la interfaz entre la cadena ligera y pesada: se construyeron variantes de isoleucina y leucina en el contexto de las variantes VH16-R94K como se muestra en el cuadro 15. Las mediciones de afinidad y estabilidad revelaron que la isoleucina fue superior a la valina en la retromutación de la posición 44, mientras que el cambio por una leucina solo produjo un leve mejoramiento a pesar de ser una elección más lógica.

124

CUADRO 15

Marcación en FACS de anticuerpos anti-CD19 humanizados retromutados/de afinidad madurada en líneas de células de tumor de Raji. Los valores (indicados como marcación relativa en la FACS de las células de Raji) corresponden a la fluorescencia de punto medio (MPF) de los anticuerpos, medida por medio de citometría de flujo, expresada como porcentaje de la fluorescencia observada para el anticuerpo quimérico FMC63. También se indica el grado de expresión transitoria de IgG y la estabilidad del FAB de los anticuerpos anti-CD19 humanizados retromutados/de afinidad madurada

Anticuerpo	Marcación relativa en FACS de células de Raji	Expresión transitoria (mg/l)	Tm FAB (°C)
VH16 R94K VL43 P44I	69.44	17	81.37
VH16 R94K VL43 P44L	37.50	18	80.10

Remoción de un sitio de desamidación potencial. La desamidación es una ruta principal de degradación de anticuerpo. La desamidación de Asn a Asp es altamente dependiente de la secuencia y ocurre en regiones de la proteína que se sabe o se predice que son flexibles como en las regiones CDR (Bischoff y Kolbe (*Journal of Chromatography B*, 662 (1994), 261-278); esto usualmente incluye residuos de Asn localizados en CDR. Se identificó una alta probabilidad de desamidación de su asparagina en CDR3 de la cadena ligera de FMC63 en las posiciones 91 a 93 (GNT). Por lo tanto, para prevenir la desamidación putativa, se investigaron los siguientes cambios en el contexto de la cadena pesada VH16-R94K: VL43-N92A, VL43-T93V y VL-43-T93A, como se muestra en el cuadro 16. Se encontró que tanto N92A como T93A mantienen la afinidad de unión. También se encontró que la variante N92A tiene estabilidad de FAB mejorada.

125

CUADRO 16

Marcación en FACS de anticuerpos anti-CD19 humanizados
retromutados/de sitio de desamidación removido en líneas de células de
tumor de Raji. Los valores (indicados como marcación relativa en la
5 FACS de las células de Raji) corresponden a la fluorescencia de punto
medio (MPF) de los anticuerpos, medida por medio de citometría de flujo,
expresada como porcentaje de la fluorescencia observada para el
anticuerpo quimérico FMC63. También se indica el grado de expresión
transitoria de IgG y la estabilidad del FAB de los anticuerpos anti-CD19
10 humanizados retromutados/de sitio de desamidación removido

Anticuerpo	Marcación relativa en FACS de células de Raji	Expresión transitoria (mg/l)	Tm FAB (°C)
VH16 VL43	7.14	20	83.54
VH16 R94K VL43	26.79	60	82.36
VH16 R94K VL43 N92A	25.86	33	84.09
15 VK16 R94K VL43 T93V	17.44	34	82.43
VH16 R94K VL43 T93A	34.09	35	82.81

Se efectuaron otros mejoramientos del aceptor humano VL43 en la posición F71. La actividad de unión a las células Raji de VH16 R94K VL43
20 F71H (SEQ ID NO: 61), VH16 R94K VL43 F71S (SEQ ID NO: 62) y VH16 R94K VL43 F71T (SEQ ID NO: 63), fue similar a la actividad de unión de VH16 R94K VL43.

Combinación de retromutaciones y mutaciones diseñadas
racionalmente

25 Para aumentar más la unión a las células de Raji, se combinaron retromutaciones y mutaciones diseñadas racionalmente en una aproximación sistemática en la que se probó un número limitado de combinaciones. La mayoría de las mutaciones mejoradas identificadas del cambio de tirosina a

120

fenilalanina en las cadenas pesada y ligera (véase arriba) se combinaron con los cambios de cadena ligera P44I y N92A, y también con los cambios de línea germinal V3Q y T7S.

Aunque los cambios de CDR frecuentemente tienen un efecto
5 aditivo en función de la afinidad, cuando estos cambios de CDR se
combinaron con mutaciones que afectan el armazón, el resultado es
impredecible. El cuadro 17 muestra la marcación relativa en la FACS de las
variantes VH16/VL43 que combinan mutaciones de línea germinal, armazón,
retromutaciones y mutaciones de CDR. Se encontró que combinando los
10 cambios de CDR de cadena pesada Y32F y Y97F con las retromutaciones
R94K, hay una pérdida de la unión, mientras que Y32F combinado con la
retromutación de cadena pesada R94K y el cambio de cadena ligera P44I y
N92A, mejoró mucho la unión, lo que según este método de mediciones dio
como resultado una titulación relativa media de marcación superior a la
15 quimera FMC63. Otra combinación favorable es tanto la mutación de CDR de
cadena pesada Y100BF como Y32F en el contexto de la retromutación de
cadena pesada R94K, y los cambios en la cadena ligera V3Q, T7S, Y32F,
P44I y N92A.

20

CUADRO 17

Marcación en FACS de anticuerpos anti-CD19 humanizados
retromutados /modificados de línea germinal /de afinidad madurada /de
síto de desamidación removido en líneas de células de tumor de Raji.
Los valores corresponden a la fluorescencia de punto medio (MPF) de
25 los anticuerpos, medida por medio de citometría de flujo, expresada
como porcentaje de la fluorescencia observada para el anticuerpo
quimérico FMC63

127

VL43 VH16	V3Q/T7S/ N92A	V3Q/T7S/ Y32F/N92A	V3Q/T7S/ P44I/N92A	V3Q/T7S/ Y32F/P44I/N92A
R94K	18.18	Saturación baja	83.33	111.11
Y32F/R94K	58.82	Saturación baja	133.33	Saturación baja
R94K/Y97F	Saturación baja	Sin unión	NA	Saturación baja
R94K/Y100 _b F	NA	NA	101.01	144.93
Y32F/R94K/Y97F	16.95	Sin unión	Saturación baja	6.67

5

Las combinaciones que presentan alta actividad de unión también retienen un alto grado de expresión transitoria (cuadro 18) y también una alta termoestabilidad del fragmento FAB (cuadro 19).

10

CUADRO 18

Grado de expresión transitoria de IgG de los anticuerpos anti-CD19 humanizados retromutados/ modificados de línea germinal /de afinidad madurada /de sitio de desamidación removido

15

VL43 VH16	V3Q/T7S/ N92A	V3Q/T7S/ Y32F/N92A	V3Q/T7S/ P44I/N92A	V3Q/T7S/ Y32F/P44I/N92A
R94K	15	45	47	34
Y32F/R94K	6.5	25	26	18
R94K/Y97F	23	31	25	22
R94K/Y100 _b F	NA	NA	NA	32
Y32F/R94K/Y97F	20	32	26	24

20

CUADRO 19

Estabilidad del FAB (°C) de los anticuerpos anti-CD19 humanizados retromutados /modificados de línea germinal /de afinidad madurada /de sitio de desamidación removido

25

VL43 VH16	V3Q/T7S/ N92A	V3Q/T7S/ Y32F/N92A	V3Q/T7S/ P44I/N92A	V3Q/T7S/ Y32F/P44I/N92A
R94K	84.29	84.34	83.13	83.31
Y32F/R94K	84.45	84.31	83.21	83.39
R94K/Y97F	83.92	83.96	82.9	83.04
R94K/Y100 _b F	NA	NA	NA	83.42
Y32F/R94K/Y97F	83.93	83.96	82.77	83.01

EJEMPLO 2

Unión de los anticuerpos CD19 a líneas de células de tumor derivadas de

células B: Análisis de citometría de flujo

5 Por medio de citometría de flujo se evaluó la unión de los anticuerpos monoclonales CD19 humanizados a células de tumor de Raji (linfoma de Burkitt humano, DSMZ ACC319), NALM-6 (leucemia de precursores de células B humanas, DSMZ ACC128) y SU-DHL-6 (linfoma de células B humanas, DSMZ ACC572) (todas las líneas celulares de DSMZ

10 Braunschweig, Alemania). Las células se incubaron con diluciones seriadas de cada anticuerpo monoclonal humanizado. Se usó una IgG1 humana irrelevante como control negativo. Las células se lavaron y se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado con ficoeritrina (PE) (eBioscience, California, EE. UU.), y se analizaron por medio de citometría de

15 flujo. Para asegurar cantidades comparables de marcación entre los candidatos humanizados y el anticuerpo murino progenitor, se usó como estándar un FMC63 quimérico, es decir, un anticuerpo que consiste en el dominio variable de cadena pesada murina de FMC63 fusionado con dominios constantes de cadena pesada de IgG1 humana, como se muestra en la SEQ

20 ID NO: 68, y el dominio variable ligero murino fusionado con el dominio constante *kappa* como se muestra en la SEQ ID NO: 69. Los resultados de la unión a las células Raji o NALM-6 se muestran en los cuadros 11 y 13-17, y la unión a la línea celular SU-DHL-6 se muestra en la figura 3. Todos los resultados de la figura 3 fueron mediciones de la intensidad fluorescente

25 media (MFI) de las células marcadas. De las curvas de MFI contra la concentración de anticuerpo, el valor de fluorescencia de punto medio (MPF) para cada anticuerpo humanizado anti-CD19 se calculó usando el software GraphPad Prism 5 (California, EE. UU.). La MPF de una curva de dosis-

respuesta representa la concentración de anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$) en donde se observa 50% de su marcación máxima. Así, los anticuerpos con una mejor actividad de unión sobre las células tienen valores de MPF más bajos ($\mu\text{g/ml}$). En los cuadros 11 y 13-17, los valores representan la MPF relativa entre el FMC63 quimérico y las variantes anti-CD19 humanizadas, y se calcularon de la siguiente manera: $[1/(\text{MPF de FMC63 quimérico} / \text{MPF de anticuerpo anti-CD19 humanizado})] \times 100$. A mayor porcentaje mejor es la actividad de unión del anticuerpo.

La figura 3 muestra el notable mejoramiento de la afinidad para las células SU-DHL-6 a lo largo de los diferentes pasos de humanización del anticuerpo VH16/VL43 al anticuerpo VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A. Este último alcanza una fuerte afinidad por las células B, similar a la quimera FMC63. Los mejoramientos de afinidad de los anticuerpos humanizados FMC63 a las células son un resultado directo de mutaciones que sustancialmente retienen o mejoran las propiedades de unión de los armazones aceptores humanos injertados con CDR como se describe arriba.

EJEMPLO 3

Análisis de Scatchard de la unión de los anticuerpos anti-CD19 humano a las células de tumor de Raji

20

Análisis de Scatchard de la unión de anticuerpos humanizados a células B de Raji de tumor

La afinidad de unión constante de un anticuerpo por su objetivo se puede determinar con una curva de saturación de unión. En el equilibrio, las cantidades de anticuerpo unido a su sitio de unión y libre son indicativas de la constante de unión de disociación K_d . Usualmente, para un solo sitio de unión, la relación anticuerpo unido/libre contra anticuerpo unido tiene una correlación lineal, en donde la pendiente corresponde al inverso de la

25



constante de unión K_d .

Los anticuerpos probados se marcaron con el colorante fluorescente europio Eu^{3+} (PerkinElmer, Massachusetts, EE. UU.). El Eu^{3+} ofrece la posibilidad de cuantificar la cantidad de moléculas de anticuerpo
5 unidas a las células y también las moléculas de anticuerpo libres. La saturación de la unión de los candidatos humanizados seleccionados a las células de Raji se analizó por medio de Eu^{3+} usando fluorescencia resuelta en el tiempo. Para demostrar la especificidad de unión de los candidatos marcados con Eu^{3+} a la superficie celular, sin comportamiento inespecífico del
10 colorante Eu^{3+} , también se marcó con Eu^{3+} una IgG1 humana de isotipo negativo.

Las células de Raji, como se describe en el ejemplo 2, se desarrollaron en medio RPMI-1640 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Chemie
15 Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), 2 mM de ultraglutamina 1 (Lonza, Verviers, Bélgica) y 1% de penicilina/estreptomicina (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza). Las células se lavaron con el mismo medio de cultivo y se ajustaron a una concentración final de 1×10^6 células/ml. Un volumen de 100 μl de células de Raji se sembró en una placa de 96 pocillos de fondo en
20 forma de U. Se prepararon diluciones seriadas de anticuerpos marcados con Eu^{3+} en PBS-2.5% FBS-0.05% azida de sodio (NaN_3) en una placa separada de 96 pocillos, y se enfrió a 4°C . Después se transfirió un volumen de 100 μl de cada dilución de anticuerpo marcado con Eu^{3+} sobre las células de Raji, correspondiendo a una escala de dilución final para los anticuerpos marcados
25 con Eu^{3+} de 13.3 nM a 6.5 pM. Las células se incubaron con el Eu^{3+} -anticuerpo durante 15 minutos sobre hielo para alcanzar el equilibrio. La cantidad de anticuerpos marcados con Eu^{3+} libres se midió transfiriendo alícuotas de sobrenadante libre de células (los volúmenes se ajustaron

empíricamente dependiendo de la concentración del anticuerpo; las células se centrifugaron a 1300 RPM durante 2 min), en una placa nueva que contenía 100 μ l de solución Delfia (PerkinElmer, Massachusetts, EE. UU., un intensificador de la fluorescencia de Eu^{3+}). Para asegurarse de la eliminación completa del sobrenadante, las células se centrifugaron una vez más a 1300 RPM durante 2 minutos. Después de la segunda centrifugación, el sobrenadante se desechó y las células se lavaron 2 veces con 200 μ l de amortiguador de unión frío (PBS-2.5% FBS-0.05% NaN_3). Las pellas celulares se resuspendieron en 100 μ l de solución Delfia. Se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo de ambas placas (Eu^{3+} -anticuerpo libre o unido) con un espectrofotómetro (Bio-Tek, synergy2, Vermont, EE. UU.; la longitud de onda de excitación fue de 340 nm, la longitud de onda de emisión fue de 615 nm, con un retraso de tiempo de 400 μ s y un tiempo de adquisición de 1000 μ s). La constante de disociación K_d se determinó mediante análisis de Scatchard, en donde la pendiente de la representación lineal del anticuerpo unido contra unido/libre representa $1/K_d$. La K_d se determinó por duplicado para cada anticuerpo, y cada medición de fluorescencia se hizo por triplicado. De acuerdo con la prueba de unión arriba indicada, las figuras 4A y 4B muestran un mejoramiento de K_d sorprendente a lo largo de las diferentes etapas de mutación del anticuerpo VH16-R94K/VL43 ($K_d = 47$ nM) al anticuerpo VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A ($K_d = 10.9$ nM). Este último anticuerpo tuvo una K_d mejor que el FMC63 quimérico progenitor (11.8 nM).

132

Competencia de unión entre la quimera FMC63 marcada con europio y anticuerpos anti-CD19 humanizados no marcados, o determinación de K_i

Otra forma de evaluar la afinidad de unión de cada anticuerpo humanizado es medir la competencia contra el anticuerpo FMC63 quimérico progenitor sobre células de Raji. Para inhibir la unión del FMC63 quimérico marcado con europio ($\text{Eu}^{3+}\text{FMC63}$) al antígeno CD19 expresado en las células de Raji, se agregaron concentraciones crecientes de anticuerpo no marcado junto con una cantidad constante de $\text{Eu}^{3+}\text{-FMC63}$. Para ese fin, en una placa de 96 pocillos con fondo en forma de U se sembraron volúmenes de 100 μl de células de Raji en medio RPMI-1640 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), 2 mM de ultraglutamina 1 (Lonza, Verviers, Bélgica) y 1% de penicilina/estreptomicina (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), preparadas a una concentración de 1×10^6 células/ml. Se prepararon diluciones seriadas de los anticuerpos competidores en una placa separada de 96 pocillos en PBS-2.5% FBS-0.05% NaN_3 y subsiguientemente se mezclaron con una cantidad constante de $\text{Eu}^{3+}\text{-FMC63}$. Las diluciones de anticuerpo se enfriaron a 4 °C antes de tomar 100 μl y agregarlos a las células de Raji. Las diluciones finales de los anticuerpos humanizados no marcados varió de 100 nM hasta 4.2 pM, mientras que la concentración de $\text{Eu}^{3+}\text{-FMC63}$ se mantuvo a 0.2 nM. Las células se incubaron con los anticuerpos durante 15 minutos sobre hielo. Después de alcanzar el equilibrio, las células se centrifugaron a 1300 RPM durante 2 minutos y el sobrenadante se desechó. Las pellas celulares se lavaron dos veces con 200 μl de amortiguador de unión frío, PBS-2.5% FBS-0.05% NaN_3 , y se resuspendieron en 100 μl de solución Delfia. El $\text{Eu}^{3+}\text{-FMC63}$ unido a las células se midió con fluorescencia resuelta en el tiempo como se describe

27

arriba. Se determinó la cantidad de Eu^{3+} -FMC63 (fmol) por pocillo y se graficó contra la cantidad total de anticuerpo no marcado. La curva de unión de la inhibición de Eu^{3+} -FMC63 se analizó adicionalmente con el software GraphPad Prism 5 (California, EE. UU.) usando un modelo de competencia de un sitio, y la concentración fija total de ligando de 0.2 nM; las constantes de unión de inhibición estaban en la escala nanomolar. Como se muestra en el cuadro 20, y de acuerdo con los experimentos presentados arriba, el armazón VH16VL43, que no incluye mutaciones, presenta poca afinidad por las células de Raji (72.8 nM), mientras que la variante humanizada VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A presenta una afinidad muy alta, equivalente a la quimera FMC63 (1.9 nM contra 1.4 nM). Los resultados con desviación estándar se determinaron por lo menos 3 veces.

134

CUADRO 20

Determinación de Ki de anticuerpos anti-CD19 humanizados

	Anticuerpo	Ki (nM)
	Quimera de FMC63	1.4 ± 0.32
5	IgG1 de control de isotipo	Sin competencia
	VH16/VL43	72.8
	VH16-R94K/VL43	7.6
	VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	3.9 ± 1.02
	VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	2.1 ± 0.5
10	VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	1.9
	VH16-Y32F-R94K-Y97F/VL43-V3Q-T7S-N92A	49.9

EJEMPLO 4

15 Evaluación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)

Se midió la ADCC de los anticuerpos anti-CD19 humanizados por medio de una prueba de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) usando el kit de Prueba de Citotoxicidad No Radioactiva CytoTox 96 (Promega, Madison, EE. UU.). Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se purificaron de sangre completa tratada con citrato por medio de separación estándar por Ficoll-paque; se resuspendieron en medio completo (medio RPMI-1640 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Chemie Brunschwig AG, 20 PAA, Basilea, Suiza), 2 mM de ultraglutamina 1 (Lonza, Verviers, Bélgica) y 1% de penicilina/estreptomicina (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza)), y 100U/ml de IL-2 humana (Sigma, Misuri, EE. UU.)), y se incubaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las PBMC se recogieron por

25

56/

filtración, se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio de cultivo a una densidad de 8×10^6 células/ml. La línea de células de Raji CD19⁺ descrita en el ejemplo 2 se usó como las células objetivo. Las células de Raji se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio completo a una densidad de 0.2×10^6 células/ml. Se mezclaron 50 µl de anticuerpo diluido a 1.5 µg/ml (la concentración final fue de 0.5 µg/ml) con 50 µl de las células objetivo, y se agregaron a un volumen equivalente de PBMC en una placa de 96 pocillos con fondo en forma de U. Se usó una proporción de células objetivo a células efectoras de 1:40 durante todos los experimentos. Después de 4 horas de incubación a 37 °C, las células se centrifugaron y se recogieron muestras de 50 µl del sobrenadante libre de células; se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se probaron. Se calculó el porcentaje de lisis de la siguiente manera: (Liberación de la muestra – liberación espontánea del objetivo – liberación espontánea del efector) / (liberación máxima – liberación espontánea del objetivo)* 100; en donde la liberación espontánea del objetivo es la fluorescencia de los pocillos que solo contenían células objetivo; la liberación espontánea del efector es la fluorescencia de los pocillos que solo contenían células efectoras; y la liberación máxima es la fluorescencia de los pocillos que contenían células objetivo que se habían tratado con amortiguador de lisis. El porcentaje de fondo de la lisis, obtenido en ausencia de anticuerpo (células objetivo + efectoras), se restó del porcentaje de lisis de la muestra.

Las figuras 5A y 5B muestran poca lisis específica de las células de Raji debido al control de IgG1. Sin embargo, la lisis inducida por el anticuerpo humanizado aumentó por lo menos tres veces con el anticuerpo VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A, o el anticuerpo VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A, o el anticuerpo VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A, o FMC63 quimérico (la figura 5A muestra el promedio

de 3 donadores diferentes $\pm$ desviación estándar; la figura 5B muestra los resultados de 1 donador, realizados por triplicado $\pm$ desviación estándar). Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-CD19 humanizados seleccionados producen una citotoxicidad celular en células que expresan CD19⁺ que es similar al FMC63 quimérico progenitor.

EJEMPLO 5

Inducción de apoptosis con los anticuerpos anti-CD19

Para medir la muerte celular inducida por anticuerpo se prepararon células de Raji como se describe en el ejemplo 2, a 1×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 ((Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), 2 mM de ultraglutamina 1 (Lonza, Verviers, Bélgica) y 1% de penicilina/estreptomicina (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza)), y se sembraron 100 μ l por pocillo en una placa de 96 pocillos, o 1 ml en una placa de 24 pocillos. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 15 minutos a 24 horas, con una concentración de anticuerpo que variaba de 0.0016 μ g/ml a 1 μ g/ml (0.01 μ M a 6.6 μ M). Después de la incubación, las células se centrifugaron en una placa con fondo en forma de U a 1300 RPM durante 3 minutos y se lavaron con 200 μ l de PBS. A cada pocillo se le agregaron 100 μ l de amortiguador de unión 1x (BD Pharmingen, Allschwil, Suiza), seguido por 2.5 μ l de annexin V-FITC y 2.5 μ l de yoduro de propidio (PI, BD Pharmingen, Allschwil, Suiza). Las células se incubaron con annexin V y PI a temperatura ambiente antes del análisis de citometría de flujo. La doble marcación con annexin V y PI caracterizó la población de células muertas, mientras que las células vivas no se marcan ni con annexin V ni con PI.

25
12

La figura 6 muestra la marcación con annexin V y PI de las células de Raji incubadas con 1 µg/ml de anticuerpo durante 2.5 h. Muy sorprendentemente, mientras que los anticuerpos anti-CD19 humanizados VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A y VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A indujeron una fuerte marcación con annexin V y muerte celular, el FMC63 quimérico progenitor no tuvo efecto sobre la apoptosis. Es de notar que el ligero aumento de marcación de annexin V después del tratamiento con el FMC63 quimérico observado en la figura 6, no fue reproducible ni significativo. Llama la atención que las células marcadas con annexin V, ya desde los 15 min después de la adición de los anticuerpos anti-CD19 humanizados, y con las dos marcaciones (annexin V más PI), alcanzaron una meseta después de 4 h de incubación con anticuerpos anti-CD19 humanizados (no se muestra). El mecanismo apoptótico debido a los anticuerpos anti-CD19 es diferente de la apoptosis inducida por anti-FasL sobre las células de Raji. En realidad, el FasL no induce marcación con annexin V sobre las células de Raji (no se muestra). Este resultado prueba que la humanización dio nuevas características al anticuerpo anti-CD19. La nueva característica apoptótica dada a los anticuerpos anti-CD19 humanizados, además de su capacidad para activar la adhesión de célula homotípica (no se muestra) en comparación con el FMC63 quimérico progenitor, es inesperada y de extrema importancia con respecto a los estudios sobre anticuerpos anti-CD20. En realidad, Beers *et al.* mostraron que los anticuerpos anti-CD20 con fuertes propiedades apoptóticas y de adhesión homotípica tuvieron una mejor capacidad de agotamiento de células B en un animal (Beers S.A. *et al*, 2008, *Blood* 112, p. 4170-4177). Además, las células de Raji se marcaron con annexin V ya desde los 15 min después de la adición de los anticuerpos anti-CD19. La marcación alcanzó una meseta después de 4 h de incubación. Este evento de apoptosis rápida es superior a

32

los anticuerpos anti-CD20, cuyos efectos apoptóticos se observan generalmente después de 24 h (Chan H.T.C. *et al.*, *Cancer Research*, 63:5480-5489).

5

EJEMPLO 6

Inhibición de la proliferación de células B malignas *in vitro*

Proliferación –Azul Alamar

Para medir la inhibición de la proliferación celular realizada por los anticuerpos, se sembraron células (Raji o SU-DHL-6, que se describen en el ejemplo 2) a una densidad de 2×10^5 células por ml, con 100 μ l por pocillo. Las células se incubaron con 100 μ l de anticuerpos previamente esterilizados y se diluyeron en medio RPMI-1640 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), 2 mM de ultraglutamina 1 (Lonza, Verviers, Bélgica) y 1% de penicilina/estreptomicina (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), para alcanzar concentraciones finales de 0.0016 μ g/ml a 1 μ g/ml (0.01 μ M a 6.6 μ M). Las placas se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 72 horas. Entonces se les agregaron a las células 20 μ l de azul Alamar (AbD Serotec, Düsseldorf, Alemania) durante 4 a 8 h. Las células en crecimiento ocasionan una reducción química de la fluorescencia del azul Alamar que se monitorea en una longitud de onda de excitación a 540 nm y de emisión a 620 nm. Se calcularon las diferencias de porcentaje entre las células tratadas y no tratadas (solo vehículo) de experimentos realizados por triplicado. La figura 7A muestra el grado de proliferación de SU-DHL-6 después de 72 h de incubación con los anticuerpos. Una IgG1 irrelevante y un anticuerpo anti-HLA-DR que se une fuertemente a SU-DHL-6 se usaron como control negativo y positivo, respectivamente. Los anticuerpos

131

humanizados VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A, VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A y VH16-R94K-Y100BF / VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A (no se muestra) tuvieron una fuerte función inhibitoria sobre la proliferación celular incluso a concentraciones tan bajas como 0.01 µg/ml. Por lo tanto, además de la inducción temprana de la apoptosis, los anticuerpos anti-CD19 bloquean la proliferación de células B en el transcurso de 72 h.

Clonogenicidad

La prueba clonogénica es otro método para evaluar la muerte de células de tumor causada por anticuerpos anti-CD19 humanizados. El método se usa regularmente para evaluar la función antiproliferativa de los anticuerpos (Chan HTC, *Cancer Research* 2003). Los presentes inventores hicieron una prueba clonogénica usando la prueba de células formadoras de colonia y medio completo MethoCult (StemCell Technologies, Grenoble, Francia). Se prepararon células de Raji (como se describe en el ejemplo 2) a 1×10^6 células/ml y se sembraron a 100 µl/pocillo en placas de 96 pocillos. Después, las células se incubaron con 100 µl de los anticuerpos previamente esterilizados y se diluyeron en medio RPMI-1640 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), 2 mM de ultraglutamina 1 (Lonza, Verviers, Bélgica) y 1% de penicilina/estreptomicina (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza); la concentración del anticuerpo fue de 0.2 µg/ml), durante 90 minutos. Las células de Raji con los anticuerpos se diluyeron entonces en medio de Iscove para alcanzar una cuenta de 500 células en 100 µl, y finalmente se mezclaron con 1.1 ml de medio MethoCult. De esta preparación se dispensaron 0.8 ml en una placa de 35 mm x 10 mm usando una jeringa de tuberculina. Las células se incubaron 9 días a 37 °C (5% de CO₂) y las colonias se contaron con un microscopio (amplificación

50x). Los resultados mostrados en la figura 7B se correlacionan con los anticuerpos humanizados que tienen propiedades apoptóticas sorprendentes (marcación con annexin V más PI) observadas previamente en el ejemplo 5; aquí, similarmente, los anticuerpos humanizados muestran propiedades antiproliferativas sorprendentemente buenas mientras que el FMC63 quimérico progenitor tiene muy poco efecto sobre la clonogenicidad o no lo tiene. Los anticuerpos anti-CD19 humanizados reducen fuertemente el número de clones de Raji ya sea induciendo apoptosis y matando durante los primeros 90 min de la incubación, o inhibiendo la división celular, o ambas cosas. Este experimento es representativo de varios experimentos y se hizo por duplicado. Los resultados confirman el efecto de los anticuerpos anti-CD19 humanizados sobre la muerte de las células B y la inhibición de su proliferación.

15

EJEMPLO 7

Internamiento del anticuerpo monoclonal anti-CD19

Internamiento usando pruebas de Hum-Zap

Para evaluar el internamiento del anticuerpo se usó un anticuerpo secundario anti-humano conjugado con la toxina saporina (Hum-Zap, Advanced Targeting Systems, San Diego, California, EE. UU.). Cuando se interna la saporina, una proteína desactivadora de ribosoma, induce muerte celular que subsiguientemente se puede monitorear usando pruebas de azul Alamar. Células de Raji que se describen en el ejemplo 2 se sembraron a 1×10^5 células/ml, 100 μ l por pocillo en medio RPMI-1640 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), 2 mM de ultraglutamina 1 (Lonza, Verviers, Bélgica) y 1% de penicilina/estreptomicina (Chemie

Brunshwig AG, PAA, Basilea, Suiza). Los anticuerpos se diluyeron en Hum-Zap preparado previamente a 100 ng/10 µl en medio celular RPMI-1640 completo (véase arriba). A las células de Raji se les agregaron 10 µl de la mezcla de anticuerpo más Hum-Zap. Las concentraciones finales de los anticuerpos variaron de 0.5 µg/ml a 0.005 µg/ml. Las células con anticuerpos se incubaron entonces durante 48 h antes de medir la citotoxicidad usando azul Alamar. El porcentaje de proliferación celular se calculó de la siguiente manera: Fluorescencia (emisión a 590 nm) de las células tratadas con anticuerpo /Fluorescencia (emisión a 590 nm) de las células de control (solo Hum-Zap) x 100. También se hicieron controles con anticuerpos y sin Hum-Zap y no mostraron ningún efecto significativo sobre la proliferación celular después de 48 h. Los presentes inventores observaron internamiento de los anticuerpos anti-CD19 humanizados (figura 8). El internamiento de CD19 posteriormente a la interacción con los anticuerpos ya se había descrito en estudios previos, pero no es significativo después de 6 h y poco después de 24 h en células de Raji, y también en células B nuevas de sangre periférica (Ingle G.S. *et al*, *BJH*, 2007, 140, p. 46-58). Usando Hum-Zap, el anticuerpo anti-CD19 humanizado VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A se interna muy similarmente al FMC63 quimérico progenitor. Sin embargo, el anticuerpo VH16-R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A presenta mucho menos internamiento, y ningún internamiento a 10 ng/ml. Un alto grado de internamiento solo es deseable cuando se diseñan anticuerpos terapéuticos para usarse como conjugados con una carga citotóxica o toxina.

25

EJEMPLO 8

Termoestabilidad de los anticuerpos monoclonales anti-CD19 según calorimetría diferencial de barrido

La estabilidad térmica de los anticuerpos monoclonales anti-CD19 humanizados y el FMC63 quimérico se comparó usando mediciones de calorimetría como se muestra en los cuadros 8, 12-16 y 19. Los perfiles de fusión de los anticuerpos monoclonales son característicos de sus isotipos (Garber y Demarest (2007), *BBRC* 355:751-7); sin embargo, la temperatura de fusión de punto medio del fragmento FAB se puede identificar fácilmente incluso en el contexto de una IgG de longitud completa. Tal fusión de punto medio de la porción FAB se usó para monitorear la estabilidad monoclonal de los candidatos humanizados.

Se hicieron mediciones calorimétricas en un microcalorímetro diferencial de barrido VP-DSC (MicroCal, Northampton, Reino Unido). El volumen celular fue de 0.128 ml, la velocidad de calentamiento fue de 1 °C/min y el exceso de presión se mantuvo a 0.441 MPa. Todos los fragmentos de proteína se usaron a una concentración de 1-0.5 mg/ml en PBS (pH 7.4). La capacidad calorífica molar de cada proteína se calculó comparándola con una muestra duplicada que contenía el mismo amortiguador en el cual se omitió la proteína. Las capacidades caloríficas molares parciales y las curvas de fusión se analizaron usando los procedimientos estándares. Los termogramas se corrigieron de la línea de base y la concentración se normalizó antes del análisis ulterior usando un modelo Non-Two State en el software Origin v7.0.

EJEMPLO 9

Estudios de agotamiento de células B

25

Agotamiento de células B en sangre completa humana

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-CD19 humanizados para agotar las células B en la sangre completa humana, se

hicieron pruebas de agotamiento de células B. Se obtuvo sangre periférica por venopunción y se diluyó por 2 en medio RPMI-1640 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), 2 mM de ultraglutamina 1 (Lonza, Verviers, Bélgica) y 1% de penicilina/estreptomicina (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza). La sangre completa diluida se sembró en una placa de 24 pocillos (1-2 ml por pocillo), se agregaron 10 µg/ml de anticuerpo o PBS (no tratada), y las placas se incubaron 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. La sangre se lisó dos veces con amortiguador de lisis RBC 10 (eBiosciences, THP Medical Products, Viena, Austria) durante 5 min a temperatura ambiente, y se centrifugó a 1100 RPM durante 3 min. La pella celular se lavó con 2 ml de amortiguador de unión (PBS, 2.5% FCS, 100 mg/l MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 0.05% NaN₃ y 10% Versene (v/v)). Después, las células se resuspendieron en 0.5 ml de amortiguador de unión y se marcaron con los anticuerpos anti-CD19-PE-Cy5 o antiCD20-PE, o anti-CD22-FITC. Después de 20 minutos de incubación sobre hielo, las células se lavaron una vez con amortiguador de unión y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células B se determinó y el porcentaje de cambio se calculó de la siguiente manera: (% de células B en las células no tratadas (PBS) - % de células B en las células tratadas con anticuerpo) / (% de células B en las células no tratadas (PBS)) x 100.

Se usaron 10 µg/ml del anticuerpo en cuatro donadores de sangre como se muestra en el cuadro 21, y se observó el agotamiento de las células B en la sangre completa después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD19 humanizados. No se observó ningún cambio en el número de células B después de un tratamiento de control con IgG1. Normalmente las células B CD19⁺ o CD20⁺ o CD22⁺ representan de 9% a 10% de la población de leucocitos cuando se incuban con la IgG1 de control. El anticuerpo VH16-

144

R94K-Y100BF/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A tuvo el impacto más alto sobre el agotamiento de células B (promedio = 15.25%), mientras que el FMC63 quimérico progenitor fue el menos eficiente (promedio = 7.25%).

145

CUADRO 21

Agotamiento de las células B de la sangre completa

Anticuerpo (10 µg/ml)	% de cambio				
	Donador 1	Donador 2	Donador 3	Donador 4	Promedio
Sin Ab (PBS)	0	0	0	0	0
IgG1 de control	0	0	0	0	0
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	5	4	22	19	12.5± 8.0
VHT6-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	15	20	10	16	15.25± 3.5
FMC63 quimérico	0	10	12	7	7.25± 4.54

EJEMPLO 10

**Variantes VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A con función efectora
mediada por complemento intensificada**

Se diseñaron varias variantes con la finalidad de intensificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). De la misma manera en que las interacciones del Fc con la unión de los receptores Fcγ median la ADCC, las interacciones del Fc con el componente C1q del complemento median la CDC. Aunque actualmente no se tiene disponible la estructura del complejo Fc/C1q, varios estudios han mapeado el sitio de unión en la IgG humana para C1q en una región centrada en los residuos D270, K322, P329 y P331 (Idusogie *et al.*, *The Journal of Immunology*, 2000, 164:4178-4184). Se diseñaron modificaciones de aminoácido en la región D269-K334 del dominio CH2 para explorar variantes que pueden mediar una intensificación de la CDC para VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A.

El estudio muestra que la sustitución de los residuos en las posiciones E269, S298 y S324 produjo variantes con un aumento de CDC de por lo menos 1.6 veces (figura 9) y hasta un máximo de 5.5 veces (figura 10).

Para crear estas secuencias codificadoras variantes de ADNc, un ADNc que codifica el ADNc de cadena pesada VH16 R94K (SEQ ID NO: 64) se convirtió en las cadenas pesadas VH16 R94K/324(NNK), VH16 R94K/S298A (SEQ ID NO: 114), VH16 R94K/E269D/S298A (SEQ ID NO: 115), VH16 R94K/S298A/S324N (SEQ ID NO: 116), VH16 R94K/E269D/S298A/S324N (SEQ ID NO: 117), por medio de mutagénesis estándar. NNK en la posición 324 describe la sustitución del codón de tipo silvestre que codifica serina con un codón NNK que provee la sustitución con los 20 aminoácidos (aleatorización dura).

10 Estas secuencias variantes de ADN codificador se ligaron en un vector basado en un vector pREP4 (Invitrogen, California. EE. UU.), modificado que lleva el promotor CMV y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento. En este vector de expresión, la secreción fue impulsada por el péptido guía VJ2C murino.

15 Para la expresión transitoria se cotransfectaron cantidades iguales de cada uno de los vectores de cadena pesada y cadena ligera en células HEK-EBNA adaptadas en suspensión (ATCC-CRL-10852) usando polietilenimina (PEI). Normalmente se transfectan 100 ml de células en suspensión a una densidad de 0.8-1.2 millones de células por ml, con una
20 mezcla de ADN-PEI que contiene 50 µg de vector de expresión que codifica la cadena pesada variante y 50 µg de vector de expresión que codifica la cadena ligera VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65). Cuando se introducen en las células hospederas los vectores de expresión recombinantes que codifican cada gen de cadena manipulado, la construcción es producida cultivando
25 adicionalmente las células durante un periodo de 4 a 5 días para permitir la secreción hacia el medio de cultivo (EX-CELL 293, medio HEK293 libre de suero, Sigma, Buchs, Suiza), suplementado con 0.1% de ácido plurónico, 4mM de glutamina, y 0.25 µg/ml de geneticina. Después, la construcción se

purificó del sobrenadante libre de células usando el medio Streamline rProtein A recombinante (GE, Suiza), y se usó para análisis ulterior.

El grado de expresión de estas variantes se lista en el cuadro 22:

148

CUADRO 22

Grado de expresión transitoria de IgG de las variantes de cadena pesada

VH16 R94K/VL43 V3Q-T7S-P44I-N92A

	Anticuerpo	Expresión (mg/l)
5	VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	38
	VH16 R94K/S324A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	48
	VH16 R94K/S324V-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	1.5
	VH16 R94K/S324L-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	20
	VH16 R94K/S324I-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	24
	VH16 R94K/S324P-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	15
10	VH16 R94K/S324T-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	0.5
	VH16 R94K/S324C-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	10
	VH16 R94K/S324M-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	24
	VH16 R94K/S324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	54
	VH16 R94K/S324Q-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	44
	VH16 R94K/S324F-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	48
15	VH16 R94K/S324Y-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	61
	VH16 R94K/S324W-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	62
	VH16 R94K/S324R-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	35
	VH16 R94K/S324D-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	42
	VH16 R94K/S324G-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	27
	VH16 R94K/S324K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	7
20	VH16 R94K/S324E-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	26
	VH16 R94K/S324H-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	-
	VH16 R94K/S298A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	54
	VH16 R94K/E269D/S298A-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	12
	VH16 R94K/S298AS324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	30
	VH16 R94K/E269D/S298AS324N-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	11

149

Toxicidad mediada por el complemento sobre células de Raji

Se usó una prueba basada en célula para medir la capacidad de las variantes para mediar la CDC. La lisis se midió usando la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) para monitorear la lisis de las células de Raji

5 variantes opsonizadas causada por el complemento de conejo crío (Harlan Laboratories, C-0099F, AN VENRAY, Países Bajos). Las células objetivo se lavaron 2 veces con medio completo (medio RPMI-1640 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) y 1% de Ultraglutamina (Lonza,

10 Verviers, Bélgica)), por centrifugación y resuspensión. Los anticuerpos variantes se agregaron a las concentraciones finales indicadas de 1 µg/ml. El suero de conejo crío se diluyó al 7.5% con medio completo y se agregó a las células objetivo opsonizadas-anticuerpo. Las placas se incubaron 3 horas a 37 °C. La citotoxicidad se midió usando el kit de prueba de citotoxicidad no

15 radioactiva Cyto Tox 96 (Promega, Madison, EE. UU.).

Datos representativos de esta prueba se muestran en las figuras 9 y 10.

Las figuras 9 y 10 muestran poca lisis específica debida al anticuerpo de control IgG1 (Herceptin®, Roche Pharma A.G., Reinach, Suiza);

20 sin embargo, la lisis inducida por complemento aumentó por lo menos 1.6 veces (figura 9) y hasta un máximo de 5.5 veces (figura 10) para el anticuerpo VH16 R94K/S324N (SEQ ID NO: 118)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65), dependiendo de la variabilidad de la prueba que se debe a la variación de la viabilidad de las células de Raji; el anticuerpo VH16

25 R94K/S298A/S324N (SEQ ID NO: 116)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65) y el anticuerpo VH16 R94K/E269D/S298A/S324N (SEQ ID NO: 117)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65) también presentaron CDC mejorada (por lo menos 4.4 veces) sobre el anticuerpo progenitor. Las figuras

9 y 10 muestran los resultados de triplicados $\pm$ desviación estándar.

EJEMPLO 11

Variantes VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A con citotoxicidad celular

5 dependiente de anticuerpo (ADCC) intensificada

Las variantes de anticuerpo anti-CD19 investigadas en el estudio descrito en el ejemplo 10 con sustitución de residuos en las posiciones E269, S298, se evaluaron para determinar su capacidad para provocar ADCC. Las actividades de ADCC de los anticuerpos se midieron por medio de la prueba de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) usando el kit de Prueba de Citotoxicidad No Radioactiva CytoTox 96 (Promega, Madison, EE. UU.).

10 células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se purificaron de sangre completa tratada con citrato por medio de separación estándar por Ficoll-paque; se resuspendieron en medio completo (medio RPMI-1640 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza), 2 mM de ultraglutamina 1 (Lonza, Verviers, Bélgica) y 1% de penicilina/estreptomicina (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza)), y

20 100U/ml de IL-2 humana (Sigma, Misuri, EE. UU.)), y se incubaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las PBMC se recogieron por filtración, se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio de cultivo a una densidad de 8×10^6 células/ml. La línea de células de Raji CD19⁺ descrita en el ejemplo 2 se usó como las células objetivo. Las células de Raji se lavaron dos veces y

25 se resuspendieron en medio completo a una densidad de 0.2×10^6 células/ml. Se mezclaron 50 μ l de anticuerpo diluido a 1.5 μ g/ml (la concentración final fue de 0.5 μ g/ml) con 50 μ l de las células objetivo, y se agregaron a un volumen equivalente de PBMC en una placa de 96 pocillos con fondo en

15

forma de U. Se usó una proporción de células objetivo a células efectoras de 1:40 durante todos los experimentos. Después de 4 horas de incubación a 37 °C, las células se centrifugaron y se recogieron muestras de 50 µl del sobrenadante libre de células; se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se probaron. Se calculó el porcentaje de lisis de la siguiente manera: (Liberación de la muestra – liberación espontánea del objetivo – liberación espontánea del efector) / (liberación máxima – liberación espontánea del objetivo)* 100; en donde la liberación espontánea del objetivo es la fluorescencia de los pocillos que solo contenían células objetivo; la liberación espontánea del efector es la fluorescencia de los pocillos que solo contenían células efectoras; y la liberación máxima es la fluorescencia de los pocillos que contenían células objetivo que se habían tratado con amortiguador de lisis. El porcentaje de fondo de la lisis, obtenido en ausencia de anticuerpo (células objetivo + efectoras), se restó del porcentaje de lisis de la muestra.

La figura 11 no muestra lisis específica de las células de Raji debido al anticuerpo de control IgG (Herceptin®, Roche Pharma A.G., Reinach, Suiza), y cierta citotoxicidad del anticuerpo progenitor; los datos mostrados son el porcentaje de citotoxicidad media ± SD de pocillos triplicados usando PBMC de un donador. Sin embargo, la lisis inducida por anticuerpo aumentó por lo menos 5 veces con el anticuerpo VH16-R94K/S298A (SEQ ID NO: 114) -VL43-V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65), y por lo menos 6.8 veces con el anticuerpo VH16-R94K/E269D/S298A (SEQ ID NO: 115) -VL43- V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65). Estos datos demuestran que las variantes seleccionadas del anticuerpo anti-CD19 tienen una citotoxicidad intensificada contra las células que expresan CD19*.

152

EJEMPLO 12

**Variantes VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A con función efectora
mediada por el complemento intensificada, basados en sustituciones de
aminoácido derivadas del barajado de los dominios de Ig-gamma3
humana e Ig-gamma1 humana /gozne de Ig-gamma3 /Fc**

Los anticuerpos IgG3 humanos generalmente tienen una CDC intensificada con respecto a los anticuerpos IgG1 humanos; esto se debe en parte a que el Fc de IgG3 tiene una afinidad de unión a C1q más alta que el Fc de IgG1 (Schumaker VN *et al.*, *Biochemistry*, 1976, 15:5175–81).

Se hicieron modificaciones de aminoácido en la región Fc de VH16 R94K basándose en las diferencias de secuencia entre las porciones Fc de IgG3 humana e IgG1 humana. En una aproximación complementaria, se hizo un barajado de los dominios de gozne y constante de IgG1 humana con los dominios de gozne y constante de la IgG3 humana para generar un isotipo quimérico del anticuerpo anti-CD19 con CDC intensificada.

El estudio muestra que la sustitución de los residuos en las posiciones K274 y N276 y una variante quimérica que consiste en el CH1 y el gozne cada uno de IgG1 y el Fc de IgG3 (designado con el sufijo 1133), resultó en un aumento de la CDC de 1.7 y 2.2 veces, respectivamente.

Para crear una secuencia codificadora variante de ADNc con la sustitución de los residuos en la posición K274 y N276, un ADNc que codifica la cadena pesada de VH16 R94K (SEQ ID NO: 64) se convirtió en las cadenas pesadas VH16 R94K/K274Q (SEQ ID NO: 119), VH16 R94K/N276K (SEQ ID NO: 120), VH16 R94K/K334R (SEQ ID NO: 121), VH16 R94K/K274Q/N276K (SEQ ID NO: 122), y VH16 R94K/K274Q/N276K/K334R (SEQ ID NO: 123), por medio de técnicas estándares de mutagénesis. Además, sustituyendo una parte del gen de cadena pesada (que codifica los

residuos de Kabat 231 hasta su extremo carboxilo) en el vector de expresión para IgG1 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A, con la parte correspondiente del gen de cadena pesada de IgG3 humana (No. de registro de GenBank NCBI X03604.1, residuos 161 a 377), se generó un isotipo
5 quimérico anti-CD19 de humano, VH16 R94K(1133) (SEQ ID NO: 124) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65). Estas secuencias variantes de ADN codificador se ligaron en un vector que está basado en un vector pREP4 (Invitrogen, California, EE. UU.) modificado que lleva el promotor CMV y una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. En el vector de
10 expresión, la secreción fue impulsada por el péptido guía VJ2C murino.

Para la expresión transitoria de estas variantes, se cotransfectaron cantidades iguales de cada vector de cadena pesada y cadena ligera en células HEK-EBNA adaptadas en suspensión (ATCC-CRL-10852) usando polietilenimina (PEI). Normalmente se transfectan 100 ml de
15 células en suspensión a una densidad de 0.8-1.2 millones de células por ml con una mezcla ADN-PEI que contiene 50 µg del vector de expresión que codifica la cadena pesada y 50 µg del vector de expresión que codifica la cadena ligera VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65). Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican cada gen de
20 cadena manipulado en las células hospederas, la construcción se produce cultivando adicionalmente las células durante un periodo de 4 a 5 días para permitir la secreción hacia el medio de cultivo (medio libre de suero HEK293, EX-CELL 293, Sigma, Buchs, Suiza), suplementado con 0.1% de ácido plurónico, 4 mM de glutamina y 0.25 µg/ml de geneticina). Después la
25 construcción se purificó del sobrenadante libre de células usando un medio Streamline rProtein A recombinante (GE, Suiza), y se usó para análisis ulterior.

El grado de expresión de estas variantes se lista en el cuadro 23.

157

CUADRO 23

Grado de expresión transitoria de IgG de variantes de la cadena pesada

VH16 R94K/VL43 V3Q-T7S-P44I-N92A

5

Anticuerpo	Expresión (mg/l)
VH16 R94K/K274Q/N276K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	12
VH16 R94K (1133)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A	21



Toxicidad mediada por el complemento sobre células de Raji

Se usó una prueba basada en célula para medir la capacidad de las variantes para mediar CDC de acuerdo con el ejemplo 10. La lisis se midió usando la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) para monitorear la lisis de las células de Raji opsonizadas variantes causada por el complemento de conejo crío (Harlan Laboratories, C-0099F, AN VENRAY, Países Bajos). Las células objetivo se lavaron 2 veces con medio completo (medio RPMI-1640 (Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Chemie Brunschwig AG, PAA, Basilea, Suiza) y 1% de Ultraglutamina (Lonza, Verviers, Bélgica), por centrifugación y resuspensión. Los anticuerpos variantes se agregaron a la concentración final indicada de 1 µg/ml. El suero de conejo crío se diluyó al 5% con medio completo y se agregó a las células objetivo opsonizadas-anticuerpo. Las placas se incubaron 3 horas a 37 °C. La citotoxicidad se midió usando el kit de prueba de citotoxicidad no radioactiva Cyto Tox 96 (Promega, Madison, EE. UU.). Datos representativos de esta prueba se muestran en la figura 12.

La figura 12 muestra poca lisis específica debido al control de IgG1 en comparación con el anticuerpo progenitor. La lisis inducida por el complemento aumentó por lo menos 1.7 veces con el anticuerpo VH16 R94K/K274Q/N276K (SEQ ID NO: 122) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65), 2 veces con el anticuerpo VH16 R94K/K274Q/N276K/K334R (SEQ ID NO: 123) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65), y 2.2 veces con el anticuerpo VH16 R94K(1133) (SEQ ID NO: 124) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65). La figura 12 muestra los resultados realizados en triplicado ± desviación estándar.

EJEMPLO 13

Establecimiento de líneas celulares para la expresión de anticuerpos

anti-CD19

5 Se desarrolló un sistema de expresión de proteína de mamífero de alto rendimiento. El sistema se basa en una línea de células CHO bien documentada (CHO-S, Invitrogen, Basilea, Suiza), que se adaptó para crecimiento en suspensión en un medio químicamente definido libre de suero; un método de transfección altamente eficiente; y una estrategia de examen
10 para identificar las poblaciones clonales de líneas de células altamente productivas. Este sistema de expresión de proteína de mamífero se usó para la expresión estable de variantes humanizadas del anticuerpo anti-CD19.

 El plásmido que lleva la secuencia de ADNc para la cadena ligera VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65) y el plásmido
15 pAE18_VH16_R94K que lleva la secuencia de ADNc para la cadena pesada VH16 R94K (SEQ ID NO: 64), usados en el ejemplo 1, se digirieron ambos con *Xba*I y *Hind*III para liberar los insertos de cadena ligera y pesada. Estos insertos se aislaron por electroforesis en gel, se extrajeron del gel, se purificaron y se clonaron en el sitio de clonación múltiple de un vector de
20 expresión basado en pGL3 de Promega (Madison, Wisconsin, EE. UU.), que previamente se había digerido con las mismas enzimas de restricción y se preparó usando los mismos métodos de electroforesis en gel y purificación. Esto produce dos plásmidos de expresión: el plásmido pGL41[18_HC] y el plásmido pGL41[18_LC], respectivamente, que llevan la cadena pesada y la
25 cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A.

 Se compró el vector pSV2neo, que expresa el gen de resistencia a la genética, *neo*, a Clontech (Mountain View, California, EE. UU.), y el

vector de resistencia a puromicina pSV-Puro se obtuvo clonando el promotor SV40 y el gen de resistencia a puromicina (*pac*) de pBABE-Puro (Addgene, Cambridge, Massachusetts, EE. UU.) en el vector pGL3 de Promega. Estos cuatro plásmidos se linealizaron usando un solo sitio de restricción en el gen

5 de resistencia a ampicilina (*amp^R*) y se purificaron de las sales remanentes por medio de precipitación etanólica. Similarmente, los vectores de expresión para más variantes de humanización (VH16 R94K/Y100_BF (SEQ ID NO: 66) - VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65) y VH16 R94K/Y100_BF (SEQ ID NO: 66) -VL43 V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A(SEQ ID NO: 67)) se cortaron

10 usando las mismas enzimas de restricción arriba descritas y se clonaron en el esqueleto de pGL41.

Para la integración estable en la línea celular hospedera CHO-S (Invitrogen), las células se sembraron en 10 ml a una densidad de 1×10^6 células por ml en un tubo de filtro biorreactor de 50 ml (TPP, Trasadingen, Suiza), y se cultivaron durante la noche. Antes de la transfección el medio de

15 cultivo celular químicamente definido (PowerCHO2, Lonza, Basilea, Suiza) se reemplazó con el medio de transfección (Opti-MEM, Invitrogen). Las células se transfectaron con 12.5 µg del coctel de vectores linealizados que contenía la mezcla de plásmidos de expresión de cadena pesada y ligera, pSV-Puro y

20 pSV2neo, usando el agente de transfección policationico JetPEI (Polyplus-transfections, Illkirch, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De 4 a 5 horas después de la transfección, las células se diluyeron con 1 volumen de medio de crecimiento. El día siguiente las células se diluyeron a una proporción de 1 a 10, 1 a 20, o 1 a 30 en medio de crecimiento que

25 contenía 5.0 µg/ml de puromicina y 500 µg/ml de geneticina, y se distribuyeron en placas de 96 pocillos. Después de 14 días de selección, las colonias resistentes al fármaco se analizaron usando una ELISA específica de anticuerpo y los clones individuales positivos se amplificaron para análisis de

producción de anticuerpo. Los clones de más rendimiento se diluyeron a concentraciones de 1, 10 y 100 células/ml en medio de cultivo celular (PowerCHO2, Lonza) para obtener poblaciones clonales. Finalmente, los clones más productores produjeron títulos en la escala de 400 a 600 mg/l del anticuerpo VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A, y 200-300 mg/l de los anticuerpos VH16 R94K/Y100_BF-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A y VH16 R94K/Y100_BF -VL43 V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A, en una prueba de lote agitado de 12 días usando el medio de cultivo celular PowerCHO2 suplementado con glutamina.

10

EJEMPLO 14

Producción de variantes defucosiladas del anticuerpo anti-CD19

En los mamíferos, los residuos de fucosa se unen al residuo más interno de GlcNAc de casi todo oligosacárido de tipo complejo enlazado a Asn por medio de un enlace α -1,6. Se preparó una línea celular estable que expresa la enzima beta-1,4-manosil-glicoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa (GNTIII) de rata. Esta enzima introduce una N-acetilglucosamina bisecante en los oligosacáridos N-enlazados de las glicoproteínas, como por ejemplo anticuerpos. Tales modificaciones cambian el oligosacárido de Fc del anticuerpo en un substrato inaccesible para la enzima Fut8 que transfiere un residuo de fucosa a la N-acetilglucosamina reductora del árbol de glicano (Longmore y Schachter, 1982, *Carbohydr Res* 365-92), inhibiendo así la fucosilación. Se compró el gen gntIII de rata a Imagenes (Berlín, Alemania) y se amplificó usando iniciadores específicos. Después, el amplicón se digirió usando las enzimas BamHI y HindIII, se purificó en gel y se clonó en el sitio de clonación múltiple abierto de BamHI, HindIII del vector de expresión pGLEX33, un vector de expresión de mamífero

25

159

basado en el plásmido pcDNA3.1 de Invitrogen (Basilea, Suiza), bajo el control del promotor CMV de ratón. El vector resultante se denominó pGNTIII.

El vector de resistencia a la puromicina pSV-Puro se obtuvo clonando el promotor SV40 y el gen de resistencia a puromicina (pac) de pBABE-Puro (Addgene, Cambridge, Massachusetts, EE. UU.) en el vector pGL3 de Promega (Madison, Wisconsin, EE. UU.). Los dos plásmidos se linealizaron usando un solo sitio de restricción en el gen de resistencia a ampicilina (ampR), y se purificaron de las sales remanentes por medio de precipitación etanólica.

10 Para la integración estable en la línea celular hospedera CHO-S (Invitrogen), las células se sembraron en 10 ml a una densidad de 1×10^6 células por ml en un tubo de filtro biorreactor de 50 ml (TPP, Trasadingen, Suiza), y se cultivaron durante la noche. Antes de la transfección el medio de cultivo celular químicamente definido (PowerCHO2, Lonza, Basilea, Suiza) se
15 reemplazó con el medio de transfección (Opti-MEM, Invitrogen). Las células se transfectaron con 12.5 µg del coctel de vectores linealizados que contenía la mezcla de pGNTIII y pSV-Puro, usando el agente de transfección policationico JetPEI (Polyplus-transfections, Illkirch, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De 4 a 5 horas después de la transfección,
20 las células se diluyeron con 1 volumen de medio de crecimiento. El día siguiente las células se diluyeron a una proporción de 1 a 10, 1 a 20, o 1 a 30 en medio de crecimiento que contenía 5.0 µg/ml de puromicina y se distribuyeron en placas de 96 pocillos. Después de 14 días de selección, se aislaron las colonias resistentes al fármaco que expresaban el gen GNTIII de
25 rata.

Se preparó una segunda línea celular estable usando la línea celular CHO-S de Invitrogen. Las células se transfectaron con un vector que expresa dos ARN de horquilla pequeños (ARNph) que anulan las enzimas

Fut8 (α 1,6-fucosiltransferasa) y GMD (GDP-manosa 4,6-dehidratasa), usando las secuencias de ARNph previamente descritas (Imai-Nishiya *et al.* 2007, *BMC Biotechnol.*, 7:84), bajo el control del promotor U6 humano y el promotor tRNA^{Val}. La construcción se le compró a GeneArt A.G. (Regensburg, Alemania). En detalle, el promotor tRNA^{Val} controla la expresión del ARNph específico de Fut8 y el promotor U6 controla la expresión del ARNph específico de GMD. La construcción se flanqueó con sitios NheI y NruI, y estos sitios de restricción se usaron para clonar el fragmento, digerido y purificado en gel, en el esqueleto del vector pGLEX1 (una versión modificada de pcDNA3.1 (Invitrogen) previamente digerido con las mismas enzimas. La anulación combinada de estas dos enzimas de la ruta *de novo* ha mostrado tener efectos sinérgicos para promover la ausencia de fucosa en la estructura de oligosacárido N-enlazado de IgG1 (Imai-Nishiya *et al.* 2007, *BMC Biotechnol.* 7:84), si las células se cultivan en ausencia de fucosa. En presencia de fucosa la reducción de la fucosilación se basaría solo en la anulación de la enzima Fut8 ya que la enzima GMD no es parte de la ruta de salvamento. Previamente se había mostrado que las células transfectadas con los casetes de expresión de doble anulación pierden 90-98 % de la fucosilación en los oligosacáridos N-enlazados (Imai-Nishiya *et al.* 2007, *BMC Biotechnol.*, 7:84). Para la integración estable en la línea celular hospedera CHO-S (Invitrogen), el vector de ARNph se linealizó usando un solo sitio de restricción en la resistencia a ampicilina. Las células se cotransfectaron con un plásmido de selección y se seleccionaron como se describe arriba para ...

Las dos líneas de células se transfectaron transitoriamente con plásmidos que codifican tanto el anticuerpo VH16 R94K (SEQ ID NO: 64) - VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65) como el anticuerpo VH16 R94K/E269D/S298A (SEQ ID NO: 115) -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65), como se describe en el ejemplo 1 y el ejemplo 11, respectivamente.

Para la transfección transitoria, las células se sembraron en 200 ml a una densidad de 1×10^6 células por ml en una botella redonda Schott de 1000 ml, y se cultivaron durante la noche. Antes de la transfección, el medio de cultivo celular químicamente modificado (PowerCHO2, Lonza) se reemplazó con 1000 ml de medio de transfección (Opti-MEM, Invitrogen). Las células se transfectaron con 250 μ g del coctel de vectores, que contenía una mezcla de 50% de ADN de cadena pesada y 50% de cadena ligera, usando el agente de transfección policationico JetPEI (Polyplus-transfections) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De 4 a 5 horas después de la transfección, las células se diluyeron con 1 volumen de medio de crecimiento. El medio se cosechó el día 5. Después de la centrifugación, el sobrenadante se filtró (0.2 μ m) y se purificó por cromatografía de afinidad de proteína A (Hitrap, GE Healthcare, Zúrich, Suiza) en un sistema purificador Akta (GE Healthcare). Las pruebas de ADCC se hicieron como se describe en el ejemplo 11.

Las variantes de anticuerpo producidas en las líneas celulares de ARNph y GNTIII arriba descritas se designaron respectivamente con el sufijo ARNph o GNTIII. La figura 13 muestra que las variantes defucosiladas tienen una ADCC por lo menos 2 veces mayor que su anticuerpo progenitor fucosilado.

EJEMPLO 15

Efecto del anticuerpo anti-CD19 sobre un injerto de células B en ratones

SCID humanizados

25

Este estudio se diseñó para evaluar el efecto *in vivo* del tratamiento anti-CD19 en ratones SCID huPBL. Antes de empezar el tratamiento, 30 ratones hembras sanas con inmunodeficiencia combinada

162

severa (SCID, HARLAN), de 5-6 semanas de edad y con pesos de 16-20 g, se distribuyeron aleatoriamente basándose en su peso corporal en un grupo de 2 animales y 4 grupos de 7 animales. El peso corporal medio de cada grupo fue comparable y estadísticamente no diferente de los otros grupos (análisis de 5 varianza). Después, todos los ratones se sometieron a irradiación en todo el cuerpo usando una fuente γ (1.8 Gy, ^{60}Co , INRA BRETENIERE, Dijon, Francia) el D0. El D1 y D8 los ratones recibieron una sola inyección s.c. de Ab agotador de células NK (antígeno mCD122, isotipo IgG2b de rata, TM-Beta 1, BioXCell, EE. UU.) a 20 mg/kg.

10 Se obtuvieron 4 muestras recién extraídas de capa leucocitaria de donadores voluntarios sanos y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se purificaron usando una centrifugación en gradiente, de acuerdo con el procedimiento de Ficoll-Paque® plus (Ref 07907, StemCell Technologies), en el transcurso de 48 h después de la extracción de la sangre 15 completa. La viabilidad de las PBMC se evaluó por medio de exclusión de azul de tripano al 0.25% antes de la inyección *in vivo*. El D3, los ratones recibieron vía inyección i.p. 3×10^7 de hPBMC (500 μl en PBS por vía i.p.) de los donadores #1, #2 y #3 (grupos 2 a 5, 2-3 ratones por donador), o PBS (grupo 1). El D1, los ratones de los grupos 2, 3, 4 y 5 recibieron una sola 20 inyección i.v. de Herecptin® (control negativo, 21.0 mg/ml, lote No. B1492), Mabthera® (control positivo, 10.0 mg/ml, lote No. B2136), anticuerpo anti-CD 19 variante VH16 R94K (SEQ ID NO: 64)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65), o anticuerpo anti-CD 19 variante VH16 R94K/S324N (SEQ ID NO: 118)-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (SEQ ID NO: 65), a 10 mg/kg/inyección, 25 respectivamente. El régimen de tratamiento se resume abajo en el cuadro 24.

163

CUADRO 24

Régimen de tratamiento

5	Grupo	No. de ratones	Irradiación	Ab agotador de células NK (D1, D8)	HPBMC (D3)	Tratamiento (D14, una sola dosis)
	1	2	Si	Si	No (PBS)	No
	2	7	Si	Si	3 donadores 2-3 ratones /donador	Herceptin® (10 mg/kg, i.v.)
	3	7	Si	Si	3 donadores 2-3 ratones /donador	Mabthera® (10 mg/kg, i.v.)
	4	7	Si	Si	3 donadores 2-3 ratones /donador	VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (10 mg/kg, i.v.)
10	5	7	Si	Si	3 donadores 2-3 ratones /donador	VH16 R94K/S324N - VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A (10 mg/kg, i.v.)

Los linfocitos B humanos en los bazos se detectaron por medio de análisis de citometría de flujo de 4 colores. Los linfocitos B humanos se cuantificaron en cada muestra por la expresión en la superficie celular de hCD45(+), mCD45(-), hCD20(+) y hCD19(+), y microglóbulos de referencia PKH26 (Ref P7458, Sigma). Se usaron los anticuerpos descritos abajo en el cuadro 25.

16/11

CUADRO 25

Anticuerpos para la detección de linfocitos B humanos

5

Antígenos	Clon	Isotipo	Fluorocromo	Ref.
hCD19	4G7	IgG ₁ , κ, de ratón	PerCP	BD ^a 345778
hCD45	HI30		APC	BD 555485
hCD20	L27		FITC	BD 345792
mCD45	30-F11	IgG _{2b} , κ, de rata	APC-Cy7	BD 557659
mlgG ₁	MOPC-21	IgG ₁ de ratón	FITC	BD 555748
mlgG ₁	X40		PerCP	BD 345817
mlgG ₁	MOPC-21		APC	BD 555751
rlgG _{2b}	A95-1	IgG _{2b} , κ, de rata	APC-Cy7	BD 552773

10

^a BD: Becton Dickinson Biosciences, le Pont de Claix, Francia

15

Para los análisis de expresión del marcador de CD, se incubaron en la oscuridad 100,000 células del bazo en 200 µl de amortiguador de tinción [PBS (Ref 17-516F, Lonza), 0.2% de BSA (Ref A7030, Sigma), 0.02% de NaN₃ (Ref S2002, Sigma)], a temperatura ambiente durante 20 min, con una solución mixta de los anticuerpos hCD19 PerCP, hCD20 FITC, hCD45 APC y mCD45 APC-Cy7, o una solución mixta de los anticuerpos mlgG1-FITC, rlgG2b-APC-Cy7, mlgG1-APC y mlgG1-PerCP. En cada caso se usaron anticuerpos de control de isotipo como controles negativos.

20

25

Los eritrocitos se lisaron usando el procedimiento de “fijación y lisis”. Brevemente, se preparó una solución amortiguadora de “fijación y lisis” agregando 25 µl de la solución fijadora IOTest 3 10X (Ref A07800, Beckman Coulter) a 1 ml de VersaLyse (Ref A09777, Beckman Coulter); 1 ml de esta mezcla se agregó a las células teñidas. Después de agitar con vórtice e incubar 10 min en la oscuridad a temperatura ambiente, las células se centrifugaron y se lavaron una vez con 3 ml de amortiguador de tinción y se resuspendieron en 0.5 ml de una solución de microglóbulos de referencia (PKH26, Ref P7458, Sigma, ½ diluido en amortiguador de tinción). Las

165

muestras se guardaron sobre hielo protegidas de la exposición a la luz hasta el análisis de FACS. Las células teñidas se analizaron con un citómetro de flujo CyFlow® space (Partec S.A.R.L.) usando una excitación de láser a una longitud de onda de 488 nm. La adquisición se detuvo después de recoger un
5 total de 10,000 hCD45(+) (si se obtenían) para cada muestra. Todos los eventos se registraron durante la adquisición.

Los resultados de la FACS se representaron por medio de una gráfica de puntos que muestra FSC contra los parámetros de SSC (detectores de dispersión delantero y lateral), para visualizar el tamaño y la complejidad
10 de las células, y por medio de gráficas de puntos que muestran la intensidad de fluorescencia (FITC) de hCD45.

El cálculo de la cuenta absoluta de las células se hizo usando la siguiente fórmula:

$$ACN = \frac{CN}{BN} \times \frac{\text{concentración de glóbulos}}{2} \times Vf \times \frac{1}{Vi}$$

en donde:

-ACN es el número absoluto de células por μ l;

5 -CN es el número de células;

-BN es el número de glóbulos;

-La *concentración de glóbulos* fue especificada en una fecha posterior dependiendo del lote provisto por el fabricante;

10 -Vf (expresado en ml) es el volumen de la solución de microglóbulos usada para resuspender la pella de células;

-Vi (expresado en μ l) es el volumen inicial de sangre usada para el análisis de FACS.

El ACN individual del total de células B en los bazos de los ratones SCID injertados el D18 se presenta en la figura 14. El porcentaje individual del total de células B en los bazos de los ratones SCID injertados el D18 se presenta en la figura 15.

A todos los ratones, excepto un ratón del grupo hPBMC y variante de anti-CD19 V18 (ratón No.3817), se les injertaron exitosamente hPBMC, dando como resultado la detección de leucocitos CD45+ humanos circulantes en la sangre del ratón. El nivel de leucocitos CD45+ humanos fue superior al 15% de las células sanguíneas en la mayoría de los ratones con trasplante de hPBMC. Además, se observaron niveles más altos de reconstitución de células humanas (alcanzando 31-73 % de leucocitos hCD45+ en las células sanguíneas) en 52% de los ratones con injerto. Los niveles de leucocitos hCD45+ no cambiaron o aumentaron durante el experimento, reflejando la eficiencia del injerto de los ratones SCID con el trasplante de PBMC humanas. También se detectaron leucocitos CD45+ en

158

los bazo 18 días después del trasplante, y el grado de injerto promedio fue de aproximadamente 45% de células hCD45+ en las células del bazo.

Los ratones se sacrificaron 4 días después de la dosificación, es decir, 18 días después del trasplante, y entonces se analizaron las poblaciones de células B humanas en los bazo. En todos los ratones con injertos del grupo de control negativo los bazo contenían de 5% a 11% de células B en leucocitos hCD45+. Las células B humanas en los bazo estaban constituidas de células individuales positivas hCD19+ o hCD20+, así como también de células B dobles positivas hCD19+ hCD20+. Se detectaron solo niveles bajos (<3%) de células B humanas en los bazo de los ratones tratados con Mabthera®, anticuerpo anti-CD19 variante VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A o anticuerpo anti-CD19 variante VH16 R94K/S324N -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A, y la disminución de la población de células B humanas fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo de Herceptin®. Por otra parte, no se observó diferencia estadística en el agotamiento de células B en los bazo entre el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 variante VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A o el anticuerpo anti-CD19 variante VH16 R94K/S324N -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A y Mabthera®.

Los resultados demostraron que una sola inyección i.v. del anticuerpo anti-CD19 variante VH16 R94K-VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A o el anticuerpo anti-CD19 variante VH16 R94K/S324N -VL43 V3Q/T7S/P44I/N92A, a 10 mg/kg, dio como resultado el agotamiento de las células B en los bazo de los ratones tratados, y la respuesta a los anticuerpos GBR fue de intensidad equivalente a la de Mabthera®.

160

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31 y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.
- 10
- 15 2.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29.
- 20
- 3.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.
- 25
- 4.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende

169

una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29; y
5 que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.

5.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
10 conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22 y 42.

6.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
15 conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una secuencia de región variable de armazón de cadena pesada que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de la región de armazón de los SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22 o 42.

7.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
20 conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una secuencia de región variable de cadena pesada del SEQ ID NO: 21.

8.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
25 conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una secuencia de región variable de armazón de cadena pesada que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de la región de armazón del SEQ ID NO: 21.

9.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de

170

conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una región variable de armazón de cadena pesada que es el producto o deriva de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V3-33*01 (SEQ ID NO: 11), V3-11*01 (SEQ ID NO: 12), V3-30*-18 (SEQ ID NO: 13) y V3-48*01 (SEQ ID NO: 14).

10.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado además porque por lo menos una de las CDR de cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende por lo menos una modificación de aminoácido.

11.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende la sustitución de aminoácido Y32F dentro de la CDR1 de cadena pesada, en donde la posición del aminoácido se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

12.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende la sustitución de aminoácido Y58F o Y59F dentro de la CDR2 de cadena pesada, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

13.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en Y96F, Y97F, Y98F y Y100_BF dentro de la CDR3 de cadena pesada, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

(21)

14.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, caracterizado además porque por lo menos una de las regiones de armazón de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de armazón correspondiente de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino correspondiente.

15.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 37, 42, 48, 49, 67, 71, 78 y 94, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

16.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 42, 67, 71, 78 y 94, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

17.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en G42R, F67L, R71K, L78V y R94K, con la condición de que, si la modificación de aminoácido es R94K, la secuencia de la región variable de cadena pesada no es el SEQ ID NO: 19 ni el SEQ ID NO: 20, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

18.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de

conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26 y 41.

5 19.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una secuencia de región variable de armazón de cadena ligera que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de la región de armazón de los SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26 y 41.

10 20.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una secuencia de la región variable de cadena ligera del SEQ ID NO: 41.

15 21.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una secuencia de región variable de armazón de cadena ligera que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de la región de armazón del SEQ ID NO: 41.

20 22.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una región de armazón variable de cadena ligera que es el producto o deriva de un gen humano seleccionado del grupo que consiste en V1-5*03 (SEQ ID NO: 3), V1-27*01 (SEQ ID NO:4), V1-39*01 (SEQ ID NO: 5) y V1-12*01 (SEQ ID NO: 6).

25 23.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o 18 a 22, caracterizado además porque por lo menos una de las CDR de cadena ligera del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende por lo menos una modificación de aminoácido.

24.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende la sustitución de aminoácido Y32F dentro de la CDR1 de cadena ligera, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

25.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque la modificación del aminoácido comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en N92A, T93A y T93V dentro de la CDR3 de cadena ligera, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

26.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 25, caracterizado además porque por lo menos una de las regiones de armazón de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, comprende por lo menos una modificación de aminoácido de la región de armazón correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente.

27.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 44, 71 y 87, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

28.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido

174

seleccionada del grupo que consiste en P44V, P44I, P44L, F71Y, F71H, F71S, F71T y Y87F, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

29.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en P44V, P44I, F71Y y Y87F, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

30.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22 y 42; y (b) una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26 y 41.

31.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 21; y (b) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41.

32.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además porque comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 54 y 55.

33.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado

25

además porque comprende una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NOs: 25, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 y 63.

34.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
5 conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 37, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 59.

35.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
10 conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 47, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 60.

36.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
15 conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 47, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 59.

37.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
20 conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 37, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 25.

38.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
25 conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 37, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 49.

39.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 47, y una región variable de cadena ligera que
5 comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 49.

40.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 43, y una región variable de cadena ligera que
10 comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 59.

41.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 64; y (b) una secuencia de cadena
15 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

42.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 66; y (b) una secuencia de cadena
20 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 67.

43.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 66; y (b) una secuencia de cadena
25 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

44.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, caracterizado además porque comprende adicionalmente regiones constantes humanas

199

pesadas y/o ligeras.

45.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado además porque la región constante pesada humana se selecciona del grupo de inmunoglobulinas humanas que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE.

46.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado además porque la región constante pesada humana es IgG humana.

10 47.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado además porque la región constante pesada humana es IgG1 humana.

48.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado además porque la región constante pesada humana comprende una variante isotípica que comprende la CH1 de IgG1 humana, el gozne de IgG1 humana, y la región Fc de IgG3 humana.

49.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 124; y (b) una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

50.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado además porque la variante isotípica presenta una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mejorada en comparación con el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se reclama en la reivindicación 47.

178

51.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado además porque la región constante ligera humana se selecciona del grupo de inmunoglobulinas humanas que consiste en *kappa* humana y *lambda* humana.

5 52.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado además porque la región constante ligera humana es *kappa* humana.

53.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52, caracterizado
10 además porque es un anticuerpo de longitud completa.

54.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52, caracterizado además porque es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb , F(ab')₂, scFv, dímeros de Fv
15 biespecíficos de una sola cadena, dianticuerpos, trianticuerpos y scFv fusionado genéticamente al mismo anticuerpo o a uno diferente.

55.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, caracterizado además porque comprende una región Fc variante de IgG humana que
20 comprende por lo menos una modificación de aminoácido con respecto a la región Fc de IgG humana del anticuerpo progenitor, en donde el anticuerpo que comprende la región Fc variante de IgG humana presenta una función efectora alterada en comparación con el anticuerpo progenitor.

56.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
25 conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque dicha función efectora es la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC).

57.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de

conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 269, 274, 276, 298, 324 y 334, en donde la posición del aminoácido de cada miembro
5 del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

58.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en E269D, K274Q, N276K, S298A,
10 S324N y K334R, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

59.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque la modificación de aminoácido comprende una combinación de sustituciones de
15 aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 269/274, 269/276, 269/298, 269/324, 269/334, 274/276, 274/298, 274/324, 274/334, 276/298, 276/324, 276/334, 298/324, 298/334, 324/334, 269/274/276, 269/274/298, 269/274/324, 269/274/334, 269/276/298, 269/276/324, 269/276/334, 269/298/324, 269/298/334, 274/276/298,
20 274/276/324, 274/276/334, 274/298/324, 274/298/334, 276/298/324 y 276/298/334, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

60.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque la
25 modificación de aminoácido comprende una combinación de sustituciones de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en E269D/K274Q, E269D/N276K, E269D/S298A, E269D/S324N, E269D/K334R, K274Q/N276K, K274Q/S298A, K274Q/S324N, K274Q/K334R, N276K/S298A, N276K/S324N,

N276K/K334R, S298A/S324N, S298A/K334R, S324N/K334R,
 E269D/K274Q/N276K, E269D/K274Q/S298A, E269D/K274Q/S324N,
 E269D/K274Q/K334R, E269D/N276K/S298A, E269D/N276K/S324N,
 E269D/N276K/K334R, E269D/S298A/S324N, E269D/S298A/K334R,
 5 K274Q/N276K/S298A, K274Q/N276K/S324N, K274Q/N276K/K334R,
 K274Q/S298A/S324N, K274Q/S298A/K334R, N276K/S298A/S324N y
 N276K/S298A/K334R, en donde la posición del aminoácido de cada miembro
 del grupo se indica utilizando el sistema de numeración de Kabat.

61.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
 10 conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque
 comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la
 secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 114; (b) una secuencia de cadena
 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

62.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
 15 conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque
 comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la
 secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 115; (b) una secuencia de cadena
 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

63.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
 20 conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque
 comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la
 secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 116; (b) una secuencia de cadena
 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

64.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
 25 conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque
 comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la
 secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 117; (b) una secuencia de cadena
 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

185

65.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 118; (b) una secuencia de cadena
5 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

66.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 119; (b) una secuencia de cadena
10 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

67.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 120; (b) una secuencia de cadena
15 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

68.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 121; (b) una secuencia de cadena
20 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

69.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 122; (b) una secuencia de cadena
25 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

70.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque comprende: (a) una secuencia de cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 123; (b) una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 65.

71.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado además porque la estructura central de carbohidrato madura unida a la región Fc de IgG humana carece de fucosa.

72.- Un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una región Fc variante de IgG humana que comprende la sustitución de aminoácido S324N, que reemplaza la serina en la posición de aminoácido 324 del anticuerpo progenitor con asparagina, en donde el anticuerpo que comprende la región Fc variante de IgG humana presenta una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mejorada en comparación con el anticuerpo progenitor.

73.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque se une a células de tumor de Raji con una fluorescencia de punto medio (MPF) de por lo menos 10% con respecto a la unión del anticuerpo quimérico correspondiente.

74.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque se une al CD19 humano con una afinidad (K_d) de 50 nM o menor.

75.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque retiene por lo menos 20% de la afinidad de unión (K_d) a CD19 del anticuerpo quimérico correspondiente.

76.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado

además porque compite por la unión a células de tumor de Raji con una afinidad (K_i) de 50 nM o menor.

77.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado
5 además porque induce apoptosis en células de tumor de Raji.

78.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado además porque la apoptosis es inducida en por lo menos 10% de las células de tumor de Raji.

79.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
10 conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque induce actividad de ADCC en células de tumor de Raji.

80.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque inhibe la proliferación de células B malignas.

81.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
15 conformidad con la reivindicación 80, caracterizado además porque retiene por lo menos 60% de la inhibición de la proliferación de células B malignas del anticuerpo quimérico correspondiente.

82.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
20 conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque inhibe la clonogenicidad de células de tumor de Raji.

83.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque causa agotamiento de las células B de la sangre.

84.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de
25 conformidad con la reivindicación 83, caracterizado además porque el agotamiento de células B causado es por lo menos idéntico al agotamiento de células B causado por el anticuerpo quimérico correspondiente.

18/12

85.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque se interna en células de tumor de Raji.

5 86.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque la temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB es mayor de 65 °C.

10 87.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado además porque la temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB del anticuerpo humanizado es equivalente a la temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB del anticuerpo murino progenitor.

15 88.- Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72.

89.- Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de una variante de FMC63 humanizada que se une al CD19 humano, depositado en un microorganismo en el DSMZ con el No. de registro DSM 23302.

20 90.- Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de una variante de FMC63 humanizada que se une al CD19 humano, depositado en un microorganismo en el DSMZ con el No. de registro DSM 23303.

25 91.- Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 88 o el ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 89 y 90.

92.- Una célula hospedera que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 88 o el ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 89 y 90, o el vector de la reivindicación 91.

93.- Un método de producción de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende cultivar la célula hospedera que se reclama en la reivindicación 92 de tal manera que se exprese el ácido nucleico y se produzca el anticuerpo.

5 94.- Un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, codificado por el ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 89 y 90.

10 95.- Una composición que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

96.- Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, enlazado a un agente terapéutico.

15 97.- Una composición que comprende el inmunoconjugado de la reivindicación 96 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 98.- Un método para inhibir el crecimiento de células de tumor que expresan CD19, que comprende poner en contacto las células con el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las células de tumor.

25 99.- El método de conformidad con la reivindicación 98, caracterizado además porque dichas células de tumor se seleccionan del grupo que consiste en células de linfoma de Burkitt humanas, células de leucemia precursoras de células B humanas, células de leucemia de células B humanas, o células de linfoma de células B humanas.

100.- Un método para agotar las células B de un sujeto, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, en una cantidad eficaz

para agotar las células B del sujeto.

101.- Un método para tratar un trastorno mediado por CD19 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72.

102.- El método de conformidad con la reivindicación 101, caracterizado además porque el trastorno mediado por CD19 se selecciona del grupo que consiste en trastornos autoinmunes que incluyen artritis reumatoide, cáncer, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, linfoma de Burkitt, linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL), linfomas cutáneos de células T, linfomas nodulares de células pequeñas hendidas, linfomas de células T periféricas, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfoma de células T (ATLL), leucemia de células T del adulto (T-ALL), linfomas foliculares centroblasticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas difusos de células grandes de linaje B, linfoma de células T de tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfomas basados en cavidades corporales asociados con VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas no diferenciados de la rinofaringe (por ejemplo, el tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, cáncer de células B resistente al anticuerpo anti-CD20, y otros linfomas de células B y leucemias.

103.- El método de conformidad con la reivindicación 101, caracterizado además porque el trastorno mediado por CD19 se selecciona del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células vellosas, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), y cáncer de células B resistente al anticuerpo anti-CD20.

182

104.- El método de conformidad con la reivindicación 101, caracterizado además porque el trastorno mediado por CD19 es un trastorno tumorigénico.

5 105.- El uso de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, como un medicamento.

106.- El uso de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por CD19.

10 107.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque es para usarse como un medicamento.

108.- El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, caracterizado además porque es para usarse en un método de tratamiento de un trastorno
15 mediado por CD19.

109.- Un artículo de fabricación que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, la composición de la reivindicación 95 o 97, o el inmunoconjugado de la reivindicación 96, para el tratamiento de un trastorno mediado por CD19.

20 110.- Un kit que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, la composición de la reivindicación 95 o 97, o el inmunoconjugado de la reivindicación 96, para el tratamiento de un trastorno mediado por CD19.

188

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que se unen al CD19 humano; más específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une al CD19 humano, que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 27, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 28, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 29; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 30, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 31, y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.

20 EA

P11/994F

1819

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Solicitante: Glenmark Pharmaceuticals S.A.

<120> Título de la invención: Anticuerpos humanizados que se unen a CD19 y sus usos

<130> Número de referencia: 17280/PCT

<160> Números de secuencias: 125

<170> Software: PatentIn versión 3.3

<210> SEQ ID NO: 1

<211> Longitud: 120

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: FMC63-VH NCBI-CAA74659

<400> Secuencia: 1

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

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> SEQ ID NO: 2

<211> Longitud: 107

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: FMC63-VL NCBI-CAA74660

<400> Secuencia: 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

199

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
100 105

<210> SEQ ID NO: 3

<211> Longitud: 94

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: humIGKV087 [V1-5*03]

<400> Secuencia: 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
85 90

<210> SEQ ID NO: 4

<211> Longitud: 94

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: humIGKV106 [V1-27*01]

<400> Secuencia: 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

192

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe
85 90

<210> SEQ ID NO: 7
<211> Longitud: 213
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: ADNc amplificador por donador clon#39
<400> Secuencia: 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

```
<210> SEQ ID NO: 8
<211> Longitud: 214
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial
```

<220> Característica:
<223> Otra Información: ADNc amplificador por donador clon#40

<400> Secuencia: 8

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Leu Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

194

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 9

<211> Longitud: 214

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: ADNc amplificador por donador clon#43

<400> Secuencia: 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 10

<211> Longitud: 214

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: ADNc amplificador por donador clon#44

<400> Secuencia: 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ser Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

196

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 11
<211> Longitud: 98
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: humIGHV199 [V3-33*01]

<400> Secuencia: 11

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> SEQ ID NO: 12
<211> Longitud: 98
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: humIGHV175 [V3-11*01]

<400> Secuencia: 12

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

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

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

197

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

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

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

Ala Arg

<210> SEQ ID NO: 13

<211> Longitud: 98

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: humIGHV195 [V3-30*18]

<400> Secuencia: 13

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> SEQ ID NO: 14

<211> Longitud: 98

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: humIGHV031 [V3-48*01]

<400> Secuencia: 14

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

198

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> SEQ ID NO: 15

<211> Longitud: 233

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: ADNc amplificador por donador clon#2

<400> Secuencia: 15

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Ser Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Asp Leu Leu Ala Ala Pro Thr Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr
100 105 110

Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu
130 135 140

199

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

Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn
165 170 175

Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly
180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met
195 200 205

Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly
210 215 220

Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro
225 230

<210> SEQ ID NO: 16

<211> Longitud: 228

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: ADNc amplificador por donador clon#5

<400> Secuencia: 16

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Ala Gly Gly Leu Val Ser Ala Ala Gly Arg Ala Ala Pro Arg
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
115 120 125

Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp
130 135 140

Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp
145 150 155 160

Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser
165 170 175

Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr
180 185 190

Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu
195 200 205

His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn
210 215 220

Val Pro Leu Pro
225

<210> SEQ ID NO: 17
<211> Longitud: 222
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: ADNc amplificador por donador clon#16

<400> Secuencia: 17

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Val Gly Gly Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro
115 120 125

Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val

201

130 135 140

Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp
145 150 155 160

Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser
165 170 175

Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro
180 185 190

Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val
195 200 205

Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro
210 215 220

<210> SEQ ID NO: 18
<211> Longitud: 224
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: ADNc amplificador por donador clon#20

<400> Secuencia: 18

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Ile Met Gly Ala Glu Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu
115 120 125

Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val
130 135 140

Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe
145 150 155 160

Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe
165 170 175

Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu
180 185 190

Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys
195 200 205

Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro
210 215 220

<210> SEQ ID NO: 19
<211> Longitud: 120
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH2

<400> Secuencia: 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Thr His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 20
<211> Longitud: 120
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH5

<400> Secuencia: 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 21

<211> Longitud: 120

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: VH16

<400> Secuencia: 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

204

Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> SEQ ID NO: 22
 <211> Longitud: 120
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: VH20

<400> Secuencia: 22

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> SEQ ID NO: 23
 <211> Longitud: 112
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: VL39

<400> Secuencia: 23

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

205

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

<210> SEQ ID NO: 24
 <211> Longitud: 112
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: VL40

<400> Secuencia: 24

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

<210> SEQ ID NO: 25
 <211> Longitud: 112
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: VL43

<400> Secuencia: 25

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

206

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

<210> SEQ ID NO: 26
<211> Longitud: 112
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL44

<400> Secuencia: 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

<210> SEQ ID NO: 27
<211> Longitud: 10
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

209

<220> Característica:
 <223> Otra Información: HCDR1

<400> Secuencia: 27

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser
 1 5 10

<210> SEQ ID NO: 28
 <211> Longitud: 16
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: HCDR2

<400> Secuencia: 28

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 29
 <211> Longitud: 12
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: HCDR3

<400> Secuencia: 29

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> SEQ ID NO: 30
 <211> Longitud: 11
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: LCDR1

<400> Secuencia: 30

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> SEQ ID NO: 31
 <211> Longitud: 7
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: LCDR2

<400> Secuencia: 31

His Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

<210> SEQ ID NO: 32
 <211> Longitud: 9
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

208

<220> Característica:
<223> Otra Información: LCDR3

<400> Secuencia: 32

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> SEQ ID NO: 33
<211> Longitud: 120
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-G42R

<400> Secuencia: 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 34
<211> Longitud: 120
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-F67L

<400> Secuencia: 34

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 35
<211> Longitud: 120
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R71K

<400> Secuencia: 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 36
<211> Longitud: 120

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: VH16-L78V

<400> Secuencia: 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 37

<211> Longitud: 120

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: VH16-R94K

<400> Secuencia: 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 38
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-P44V

<400> Secuencia: 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 39
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-F71Y

<400> Secuencia: 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

212

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 40
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-Y87F

<400> Secuencia: 40

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 41
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-V3Q/T7S

<400> Secuencia: 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 42
<211> Longitud: 120
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-Q6E

<400> Secuencia: 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 43
 <211> Longitud: 120
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: VH16-Y32F/R94K

<400> Secuencia: 43

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Phe
 20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> SEQ ID NO: 44
 <211> Longitud: 120
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: VH16-R94K/Y96F

<400> Secuencia: 44

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Phe Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 47
<211> Longitud: 120
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/Y100bF

<400> Secuencia: 47

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> SEQ ID NO: 48
 <211> Longitud: 107
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: VL43-Y32F

<400> Secuencia: 48

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Phe
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> SEQ ID NO: 49
 <211> Longitud: 107
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
 <223> Otra Información: VL43-P44I

<400> Secuencia: 49

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

218

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 50
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-P44L

<400> Secuencia: 50

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Leu Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 51
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-N92A

<400> Secuencia: 51

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 52
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-T93V

<400> Secuencia: 52

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Val Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 53
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-T93A

<400> Secuencia: 53

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ala Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105
 <210> SEQ ID NO: 54
 <211> Longitud: 120
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial
 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VH16-R94K/Y97W
 <400> Secuencia: 54
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys His Tyr Trp Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> SEQ ID NO: 55
 <211> Longitud: 120
 <212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: VH16-Y32F/R94K/Y97F

<400> Secuencia: 55

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Phe
20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys His Tyr Phe Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO: 56

<211> Longitud: 107

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: VL43-Y32F/P44I

<400> Secuencia: 56

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

222

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 57
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-V3Q/T7S/N92A

<400> Secuencia: 57

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 58
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-V3Q/T7S/Y32F/N92A

<400> Secuencia: 58

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 61
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-F71H

<400> Secuencia: 61

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 62
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-F71S

<400> Secuencia: 62

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 63
<211> Longitud: 107
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-F71T

<400> Secuencia: 63

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Thr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO: 64
<211> Longitud: 450

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: VH16-- R94K cadena pesada

<400> Secuencia: 64

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245250255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260265270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275280285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290295300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305310315320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325330335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340345350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355360365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370375380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385390395400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405410415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420425430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435440445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 65
<211> Longitud: 214
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-- V3Q/T7S/P44I/N92A cadena ligera

<400> Secuencia: 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
151015

26
22

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 66
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-- R94K Y100BF cadena pesada

<400> Secuencia: 66

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 67
<211> Longitud: 214
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43-- V3Q/T7S/Y32F/P44I/N92A cadena ligera

<400> Secuencia: 67

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 68
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: FMC63 quimérico Cadena Pesada

<400> Secuencia: 68

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

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 69

<211> Longitud: 214

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: FMC63 quimérico Cadena Ligera

<400> Secuencia: 69

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

2.34

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> SEQ ID NO: 70
<211> Longitud: 39
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Cuadro-1 Iniciador Directo

<400> Secuencia: 70
gatcgatcc actggtgata ttgtgatgac ycagwtcc 39

<210> SEQ ID NO: 71
<211> Longitud: 36
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Cuadro-1 Iniciador Inverso

<400> Secuencia: 71
gatcgcggcc gcacactctc cctgttgaa gctctt 36

<210> SEQ ID NO: 72
<211> Longitud: 36
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Cuadro-2 Iniciador Directo I

<400> Secuencia: 72
gatcgatcc actggtgagg tgcagctggt ggagtc 36

<210> SEQ ID NO: 73
<211> Longitud: 36
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Cuadro-2 Iniciador Inverso

<400> Secuencia: 73
gatcgcggcc gctggaagag gcacgttctt ttcttt 36

<210> SEQ ID NO: 74
<211> Longitud: 21
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: CMV-IE Directo

<400> Secuencia: 74
cgcaaatggg cggtaggcgt g 21

<210> SEQ ID NO: 75
<211> Longitud: 18
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: BGH Inverso

<400> Secuencia: 75
tagaaggcac agtcgagg 18

<210> SEQ ID NO: 76
<211> Longitud: 52
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH2 mCDR1 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 76
gctcacgccg tagtcgggca ggctcacgcc agacgctgca caggagagtc tc 52

<210> SEQ ID NO: 77
<211> Longitud: 50
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH2 mCDR1 enlazador Directo

<400> Secuencia: 77
ggcgtgagcc tgcccgaacta cggcgtgagc tgggtccgcc aggctccagg 50

<210> SEQ ID NO: 78
<211> Longitud: 61
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH2 mCDR2 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 78
ggcgtgttg tagtaggttg tctcggagcc ccagatcact gccaccact ccagcccctt 60
g 61

<210> SEQ ID NO: 79
<211> Longitud: 66
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra Información: VH2 mCDR2 enlazador Directo

<400> Secuencia: 79
ggctccgaga caacctacta caacagcgcc ctgaagagcc gattcaccat ctccagagac 60
aattcc 66

<210> SEQ ID NO: 80
<211> Longitud: 51
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH2 mCDR3 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 80
catggcgtag ctgccgccgt agtagtagtg tgtggtacag taatacacgg c 51

<210> SEQ ID NO: 81
<211> Longitud: 54
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH2 mCDR3 enlazador Directo

<400> Secuencia: 81
cactactact acggcggcag ctacgccatg gactactggg gccagggaac cctg 54

<210> SEQ ID NO: 82
<211> Longitud: 52
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH5 mCDR1 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 82
gctcacgccg tagtcgggca ggctcacgcc agaggctgca caggagagtc tc 52

<210> SEQ ID NO: 83
<211> Longitud: 51
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH5 mCDR1 enlazador Directo

<400> Secuencia: 83
ggcgtgagcc tgcccgacta cggcgtgagc tggatccgcc aggctccagg g 51

<210> SEQ ID NO: 84
<211> Longitud: 66
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH5 mCDR2 enlazador Directo

<400> Secuencia: 84
ggctccgaga caacctacta caacagcgcc ctgaagagcc gattcaccat ctccaggac 60
aacgcc 66

<210> SEQ ID NO: 85
 <211> Longitud: 57
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VH5 mCDR3 enlazador Inverso

 <400> Secuencia: 85
 gtagtccatg gcgtagctgc cgccgtagta gtagtgcccc gcacagtaat aaacggc 57

 <210> SEQ ID NO: 86
 <211> Longitud: 60
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VH5 mCDR3 enlazador Directo

 <400> Secuencia: 86
 cactactact acggcggcag ctacgccatg gactactggg gccaggggaac cctgggcacc 60

 <210> SEQ ID NO: 87
 <211> Longitud: 51
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VH16 mCDR3 enlazador Inverso

 <400> Secuencia: 87
 catggcgtag ctgccgcgt agtagtagtg tctcgcacag taatacacgg c 51

 <210> SEQ ID NO: 88
 <211> Longitud: 52
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VH20 mCDR1 enlazador Inverso

 <400> Secuencia: 88
 gctcacgcc tagtcgggca ggctcacgcc agaggctaca caggagagtc tc 52

 <210> SEQ ID NO: 89
 <211> Longitud: 61
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VH20 mCDR2 enlazador Inverso

 <400> Secuencia: 89
 ggcgctgttg tagtaggttg tctcggagcc ccagatcact gaaacccact ccagcccctt 60
 c 61

 <210> SEQ ID NO: 90
 <211> Longitud: 66
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:

<223> Otra Información: VH20 mCDR2 enlazador Directo

<400> Secuencia: 90
ggctccgaga caacctacta caacagcgcc ctgaagagcc gattcaccat ctccagagac 60
aacgcc 66

<210> SEQ ID NO: 91
<211> Longitud: 51
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH20 mCDR3 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 91
catggcgtag ctgcccgcgt agtagtagtg tctcgcacag taatacacag c 51

<210> SEQ ID NO: 92
<211> Longitud: 32
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Adaptador SalI

<400> Secuencia: 92
gatcgctgac gctgaggaga cggtgaccag gg 32

<210> SEQ ID NO: 93
<211> Longitud: 37
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: HindIII VJ2C Directo

<400> Secuencia: 93
gatcaagctt gccgccacca tggagacaga cacactc 37

<210> SEQ ID NO: 94
<211> Longitud: 45
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL39 mCDR2 enlazador Directo

<400> Secuencia: 94
cacaccagcc ggctgcacag cgggggtccca tcaagggttca gcggc 45

<210> SEQ ID NO: 95
<211> Longitud: 51
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL39 mCDR3 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 95
ggtgtagggc agtgtgttgc cttgctggca gtaataagtt gcaaaatcat c 51

<210> SEQ ID NO: 96

<211> Longitud: 49
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL39 mCDR3 enlazador Directo

<400> Secuencia: 96
cagcaaggca acacactgcc ctacaccttc ggccaaggga ccaaggtgg 49

<210> SEQ ID NO: 97
<211> Longitud: 42
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL40 mCDR2 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 97
gctgtgcagc cggctggtgt gatagatcag gaggttagga ac 42

<210> SEQ ID NO: 98
<211> Longitud: 45
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL40 mCDR2 enlazador Directo

<400> Secuencia: 98
cacaccagcc ggctgcacag cgggggtccca tctcggttca gcggc 45

<210> SEQ ID NO: 99
<211> Longitud: 51
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL40 mCDR3 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 99
ggtgttagggc agtgtgttgc cttgctgaca gtaataagtt gcaaaatctt c 51

<210> SEQ ID NO: 100
<211> Longitud: 48
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL40 mCDR3 enlazador Directo

<400> Secuencia: 100
cagcaaggca acacactgcc ctacaccttc ggcggaggga ccaaggtg 48

<210> SEQ ID NO: 101
<211> Longitud: 57
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL43 mCDR1 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 101
gttcaggtac ttgctgatgt cctggctggc ccggcaagtg atggtgactc tgtctcc 57

<210> SEQ ID NO: 102
 <211> Longitud: 54
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VL43 mCDR1 enlazador Directo

 <400> Secuencia: 102
 cgggccagcc aggacatcag caagtacctg aactgggtatc agcagaaacc aggg 54

 <210> SEQ ID NO: 103
 <211> Longitud: 42
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VL43 mCDR2 enlazador Inverso

 <400> Secuencia: 103
 gctgtgcagc cggctggtgt gatagatcag gagcttaggg gc 42

 <210> SEQ ID NO: 104
 <211> Longitud: 45
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VL43 mCDR2 enlazador Directo

 <400> Secuencia: 104
 cacaccagcc ggctgcacag cgggggtccca tcaaggttca gtggc 45

 <210> SEQ ID NO: 105
 <211> Longitud: 51
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VL43 mCDR3 enlazador Inverso

 <400> Secuencia: 105
 ggtgtagggc agtgtgttgc cttgctgaca gtagtaagtt gcaaaatctt c 51

 <210> SEQ ID NO: 106
 <211> Longitud: 49
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VL43 mCDR3 enlazador Directo

 <400> Secuencia: 106
 cagcaaggca acacactgcc ctacaccttc ggccctggga ccaaagtgg 49

 <210> SEQ ID NO: 107
 <211> Longitud: 57
 <212> Tipo: ADN
 <213> Organismo: Artificial

 <220> Característica:
 <223> Otra Información: VL44 mCDR1 enlazador Inverso

241

<400> Secuencia: 107
gttcagggtac ttgctgatgt cctggctggc ccgacaagtg atggtgactc tgtctcc 57

<210> SEQ ID NO: 108
<211> Longitud: 42
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL44 mCDR2 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 108
gctgtgcagc cggctggtgt gatagatcag gaggttaggg gc 42

<210> SEQ ID NO: 109
<211> Longitud: 45
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL44 mCDR2 enlazador Directo

<400> Secuencia: 109
cacaccagcc ggctgcacag cgggggtccca tcaaggttca gcggc 45

<210> SEQ ID NO: 110
<211> Longitud: 51
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL44 mCDR3 enlazador Inverso

<400> Secuencia: 110
ggtgtagggc agtgtgttgc cttgctgaca ataataagtt gcaaaatctt c 51

<210> SEQ ID NO: 111
<211> Longitud: 49
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VL44 mCDR3 enlazador Directo

<400> Secuencia: 111
cagcaaggca acacactgcc ctacaccttt ggccagggga ccaagttgg 49

<210> SEQ ID NO: 112
<211> Longitud: 38
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: NotI Kappa

Reverse

<400> Secuencia: 112
gatcgcggcc gcttatcaac actctcccct gttgaagc 38

<210> SEQ ID NO: 113
<211> Longitud: 39

<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: Cuadro-2 Iniciador Directo II

<400> Secuencia: 113
gatcggatcc actggtcagg tycagctkgt gcagtctgg 39

<210> SEQ ID NO: 114
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/S298A cadena pesada

<400> Secuencia: 114
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195200205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210215220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225230235240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245250255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260265270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275280285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg
290295300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305310315320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325330335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340345350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355360365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370375380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385390395400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405410415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420425430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435440445

Gly Lys
450

<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/E269D/S298A cadena pesada

<400> Secuencia: 115

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245

245250255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Asp
260265270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275280285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg
290295300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305310315320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325330335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340345350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355360365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370375380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385390395400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405410415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420425430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435440445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 116
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/S298A/S324N cadena pesada

<400> Secuencia: 116

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg

242

290295300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305310315320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325330335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340345350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355360365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370375380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385390395400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405410415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420425430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435440445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 117
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/E269D/S298A/S324N cadena pesada

<400> Secuencia: 117

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
202530

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
354045

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
505560

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 118
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/S324N cadena pesada

<400> Secuencia: 118

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

<210> SEQ ID NO: 119
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/K274Q cadena pesada

<400> Secuencia: 119

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

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

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435440445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 120
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/N276K cadena pesada

<400> Secuencia: 120

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
202530

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
354045

Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
505560

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65707580

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
859095

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100105110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115120125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130135140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145150155160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165170175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180185190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195200205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 121
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/K334R cadena pesada
<400> Secuencia: 121

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 122
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/K274Q/N276K cadena pesada

<400> Secuencia: 122

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

259

Gly	Val	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35						40					45			
Ala	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
65					70					75				80	
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
		100						105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
		115					120					125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
	130					135					140				
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145					150					155					160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165					170					175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
			180					185					190		
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
		195					200					205			
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
	210					215					220				
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
225					230					235				240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
			245						250					255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
			260					265					270		
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275					280					285			
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
	290					295					300				

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 123
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K/K274Q/N276K/K334R cadena pesada

<400> Secuencia: 123

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

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

Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> SEQ ID NO: 124
<211> Longitud: 450
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:
<223> Otra Información: VH16-R94K(1133) cadena pesada

<400> Secuencia: 124

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

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

Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> SEQ ID NO: 125
 <211> Longitud: 556
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Homo sapiens

<220> Característica:
 <221> Nombre/Clave: MISC_CARACTERÍSTICA
 <222> Ubicación: (1)..(556)
 <223> Otra Información: CD19 humano

<400> Secuencia: 125

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
 1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
 20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
 35 40 45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
 50 55 60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
 65 70 75 80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
 85 90 95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
 100 105 110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
 115 120 125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
 130 135 140

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
 145 150 155 160

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
 165 170 175
 Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
 180 185 190
 Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
 195 200 205
 Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
 210 215 220
 Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
 225 230 235 240
 Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
 245 250 255
 Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
 260 265 270
 Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
 275 280 285
 Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
 290 295 300
 Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
 305 310 315 320
 Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
 325 330 335
 Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
 340 345 350
 Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
 355 360 365
 Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
 370 375 380
 Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
 385 390 395 400
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
 405 410 415
 Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
 420 425 430
 Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly

435		440		445											
Pro	Glu	Asp	Glu	Asp	Ser	Phe	Ser	Asn	Ala	Glu	Ser	Tyr	Glu	Asn	Glu
450						455					460				
Asp	Glu	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Val	Ala	Arg	Thr	Met	Asp	Phe	Leu	Ser
465					470					475				480	
Pro	His	Gly	Ser	Ala	Trp	Asp	Pro	Ser	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly
				485					490					495	
Ser	Gln	Ser	Tyr	Glu	Asp	Met	Arg	Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Ala	Pro	Gln
			500					505					510		
Leu	Arg	Ser	Ile	Arg	Gly	Gln	Pro	Gly	Pro	Asn	His	Glu	Glu	Asp	Ala
		515					520					525			
Asp	Ser	Tyr	Glu	Asn	Met	Asp	Asn	Pro	Asp	Gly	Pro	Asp	Pro	Ala	Trp
	530					535					540				
Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Met	Gly	Thr	Trp	Ser	Thr	Arg				
545					550					555					

265

Figure 1

Figure 1A

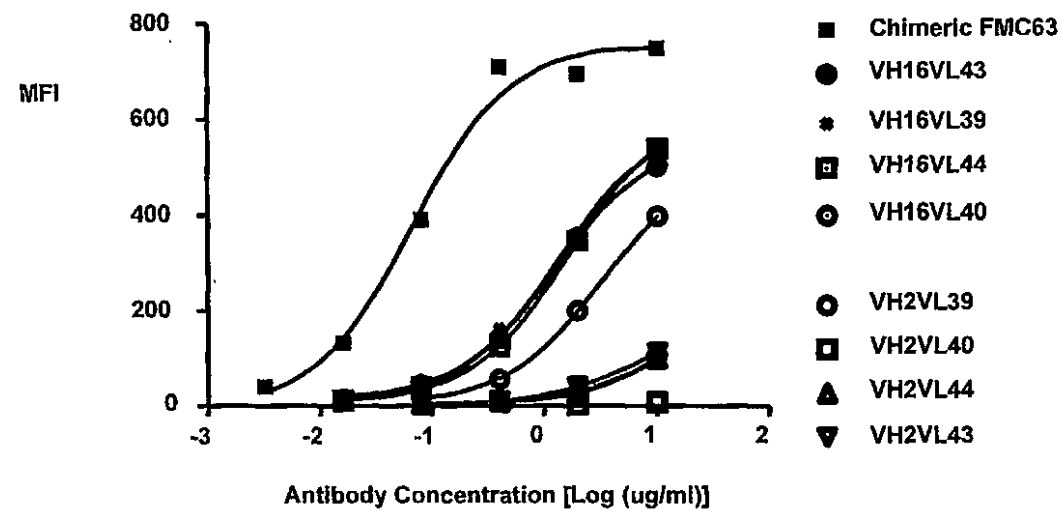


Figure 1B

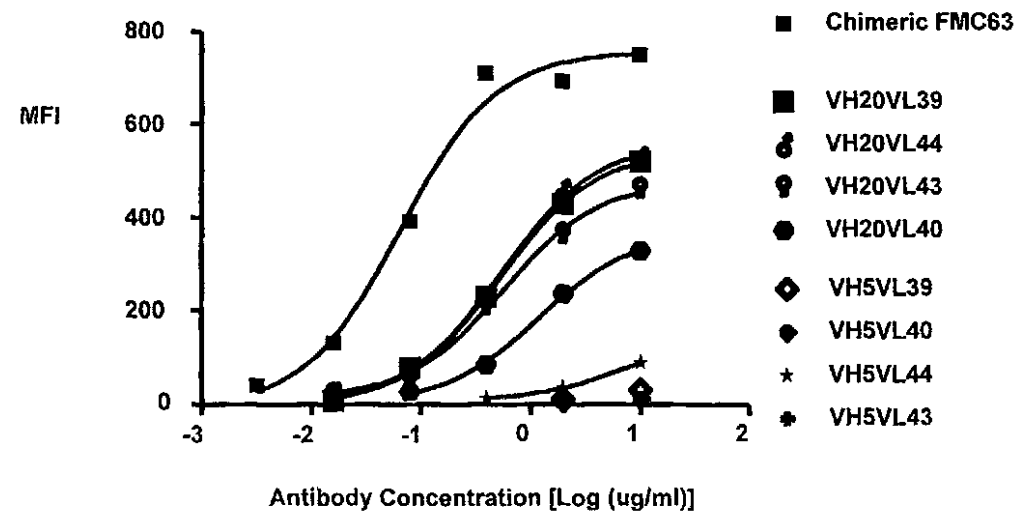


Figure 2

Figure 2A

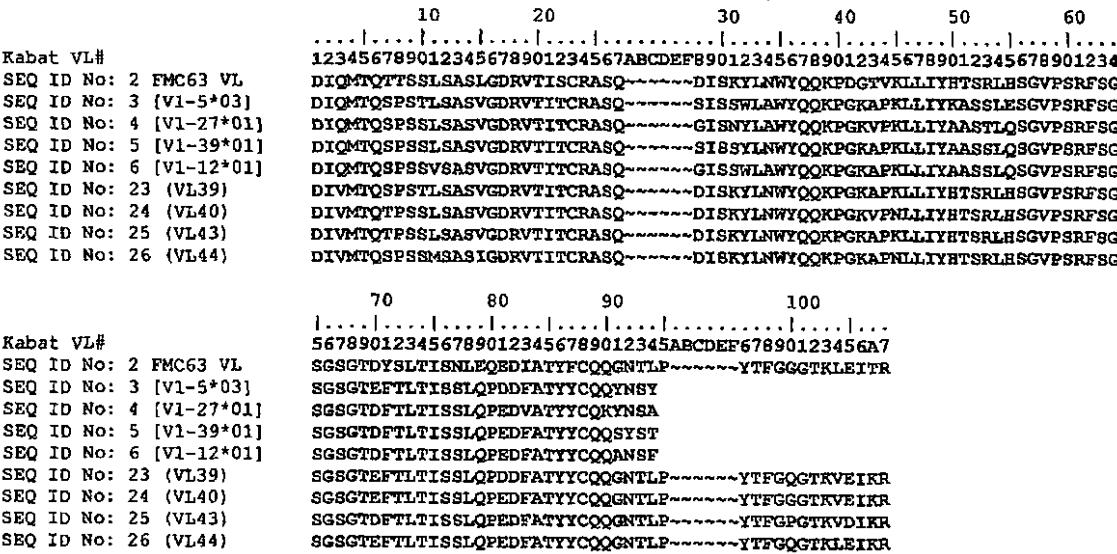


Figure 2B

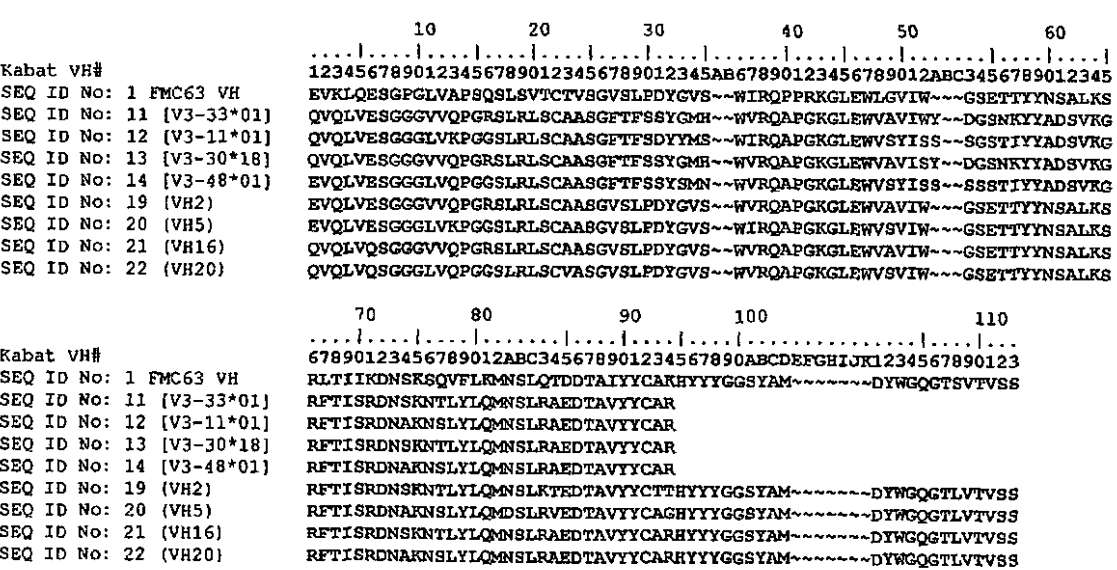
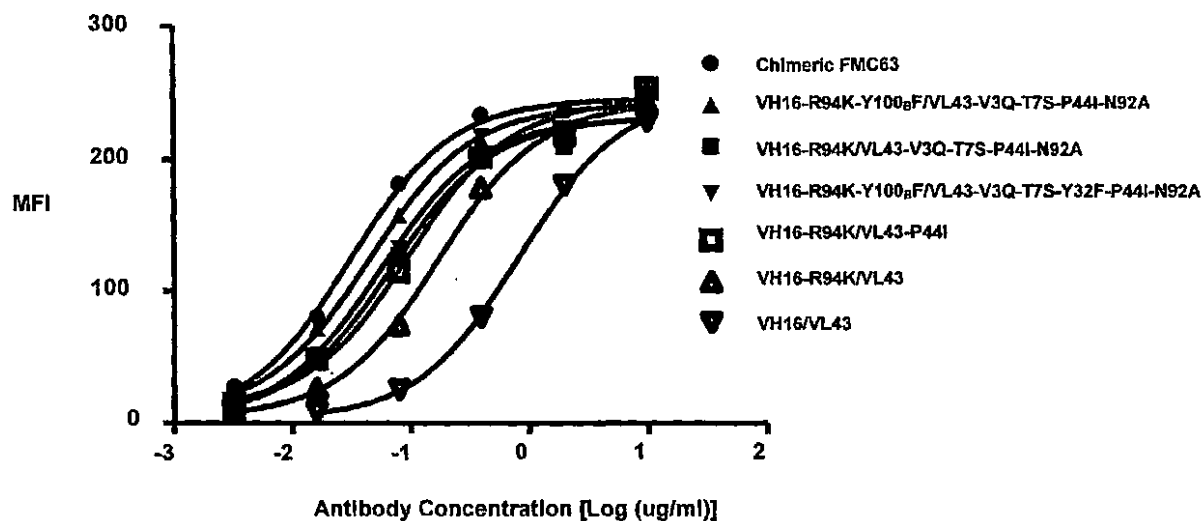


Figure 3



268

Figure 4

Figure 4A

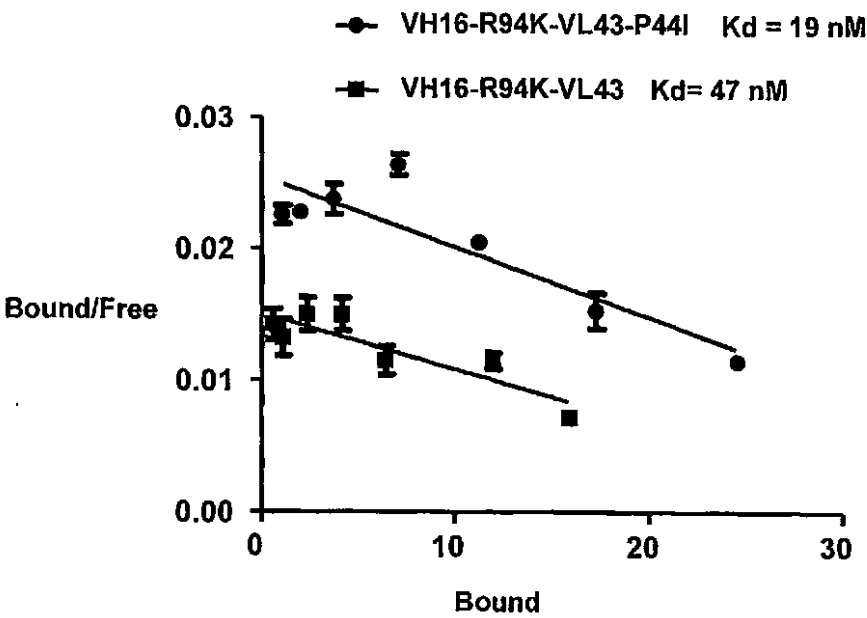


Figure 4B

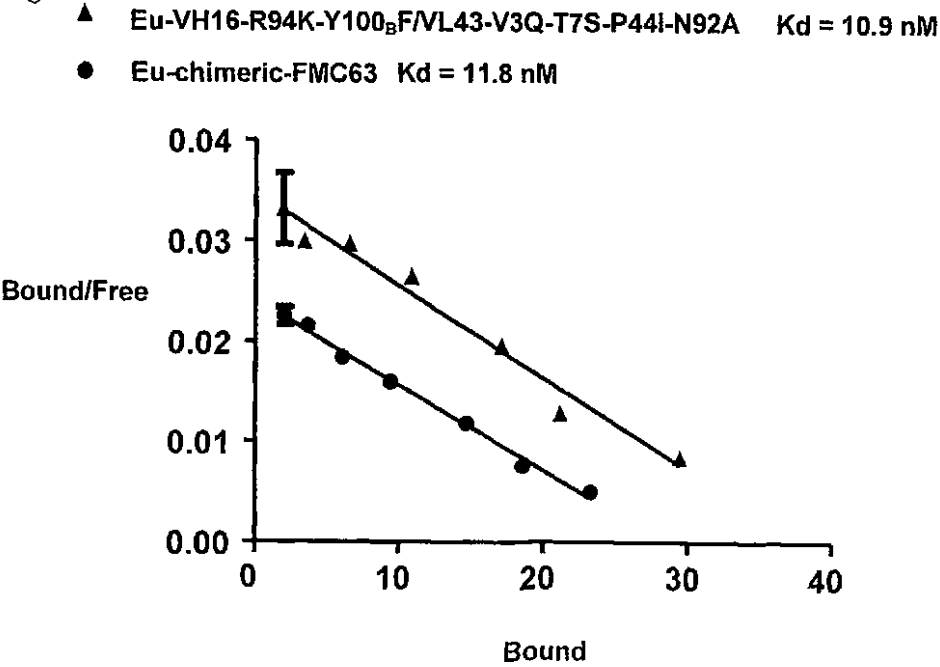
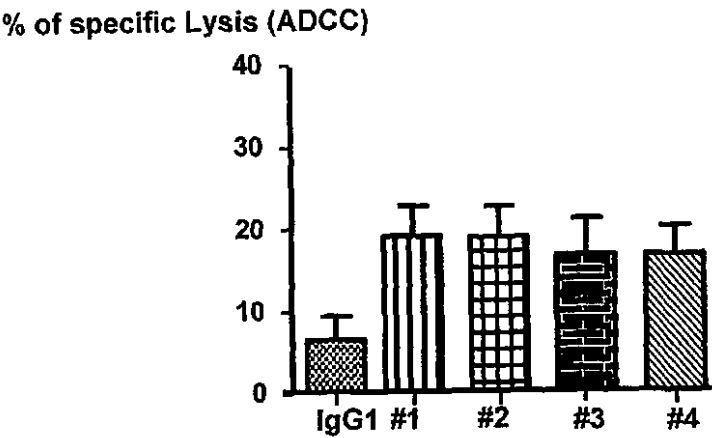


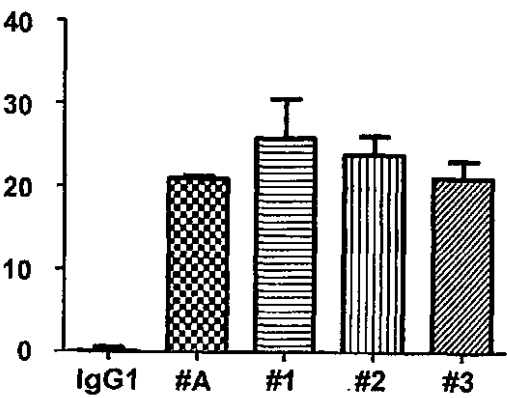
Figure 5 A



Keys	
Isotype control IgG1	IgG1
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	#1
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#3
VH16-R94K/VL43-P44I	#4

Figure 5 B

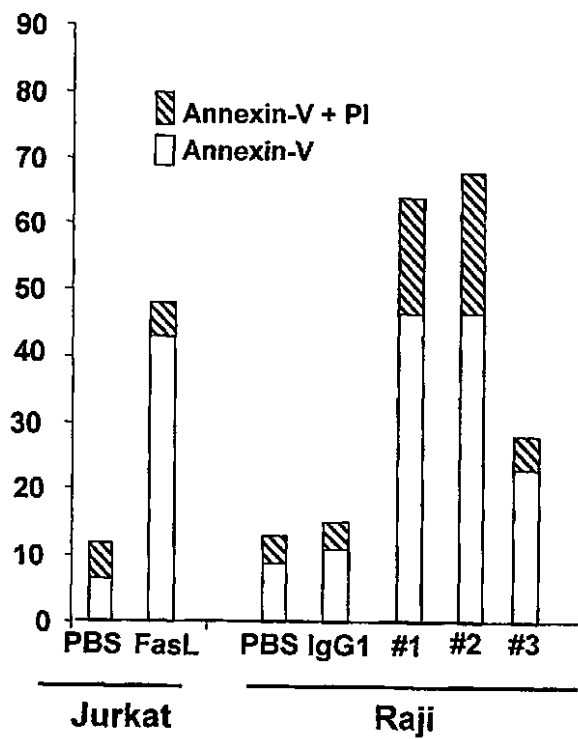
% of Specific Lysis (ADCC)



Keys	
Isotype control IgG1	IgG1
Chimeric FMC63	#A
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	#1
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#3

162

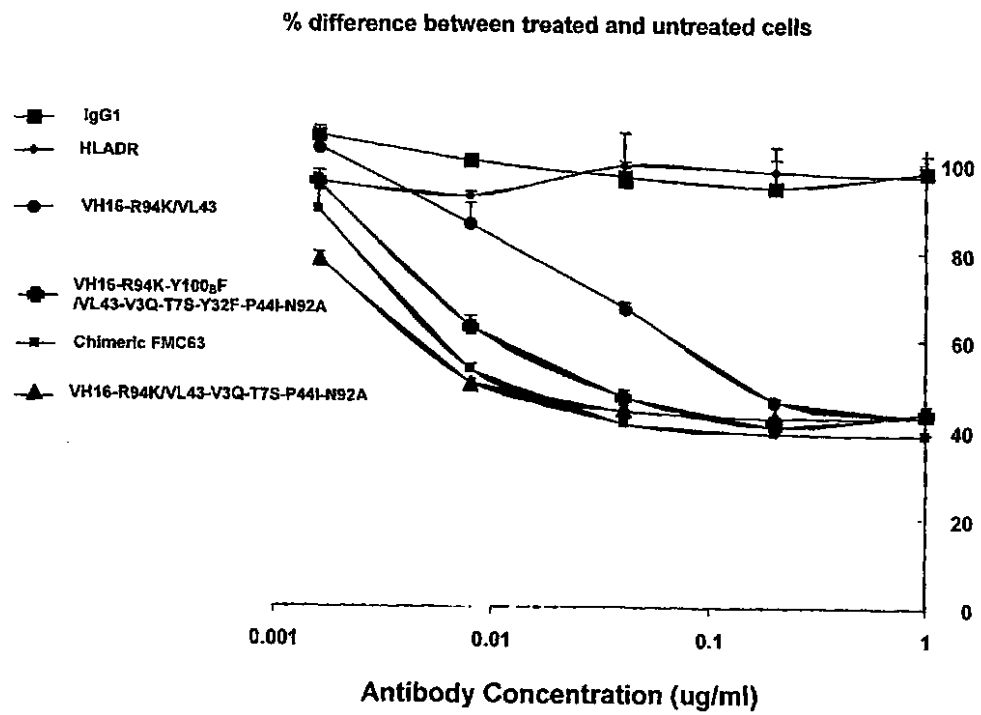
Figure 6



Keys	
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#1
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
Chimeric FMC63	#3

272

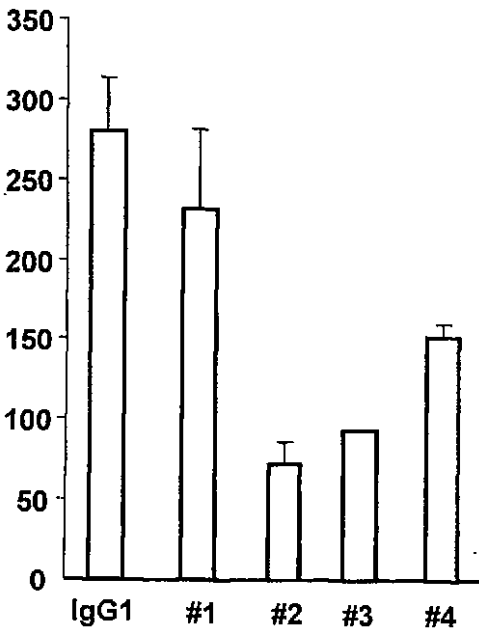
Figure 7 A



223

Figure 7 B

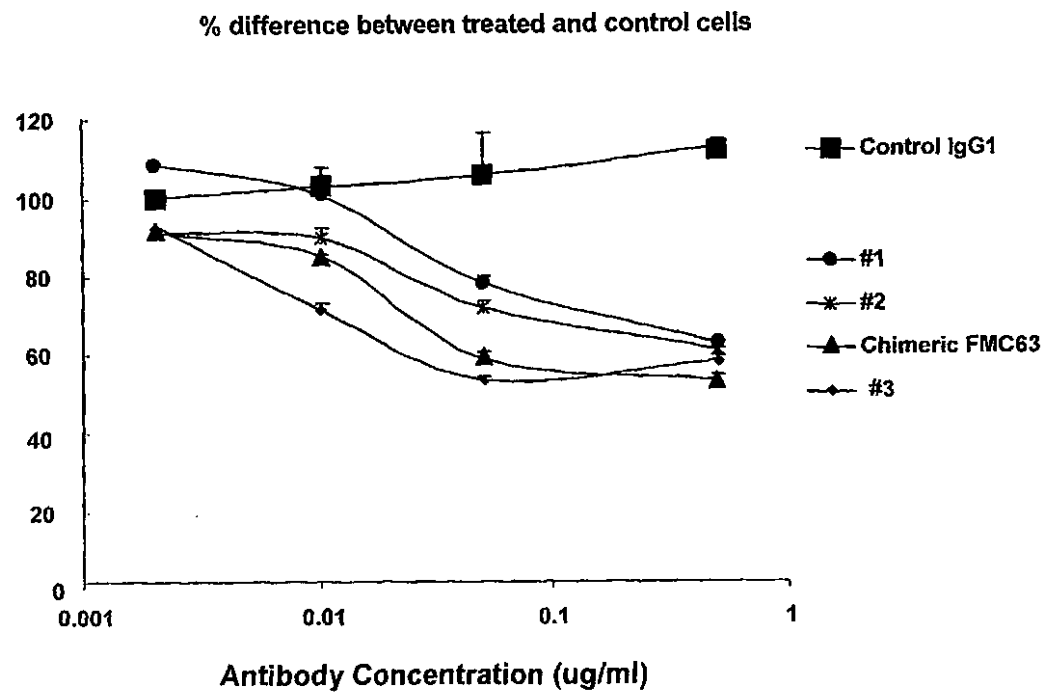
Number of colonies



Keys	
Chimeric FMC63	#1
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	#3
VH16-R94K/VL43-P44I	#4

274

Figure 8



Keys	
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-Y32F-P44I-N92A	#1
VH16-R94K-Y100 _B F/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#2
VH16-R94K/VL43-V3Q-T7S-P44I-N92A	#3

522

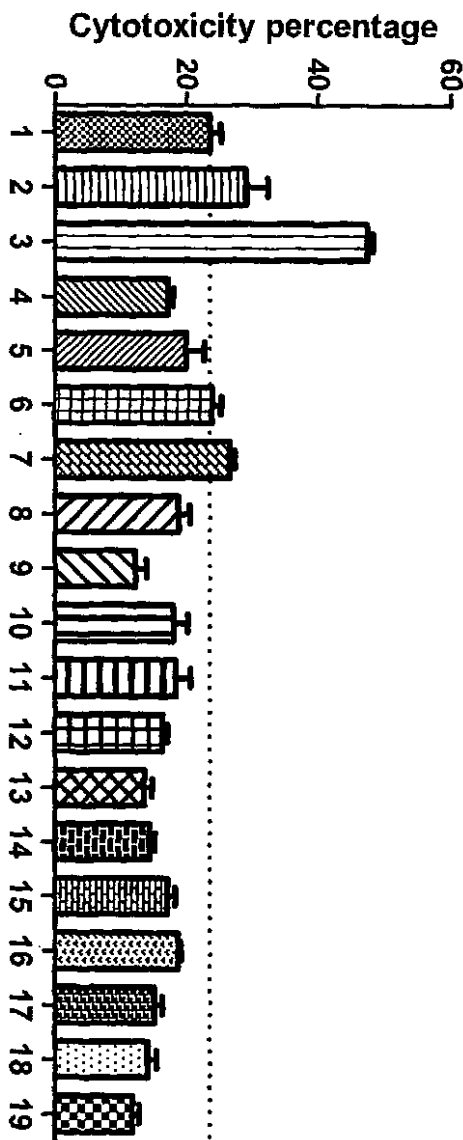


Figure 9

262

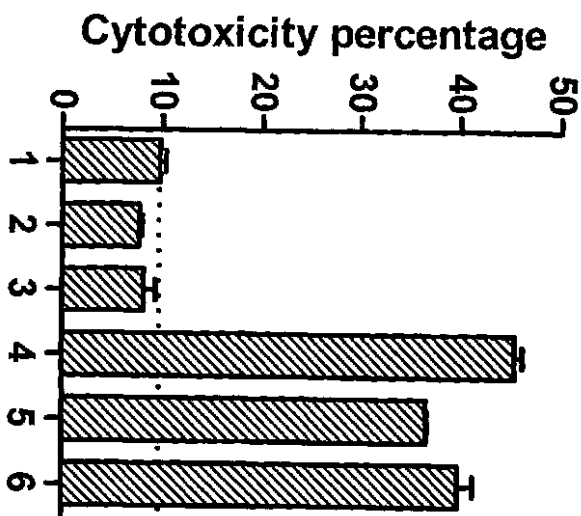
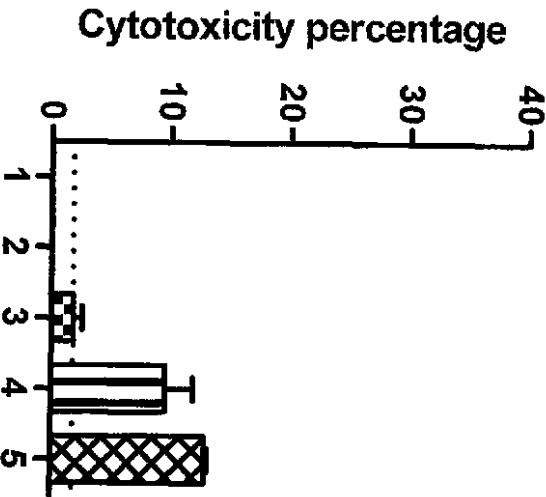


Figure 10

262

Figure 11



822

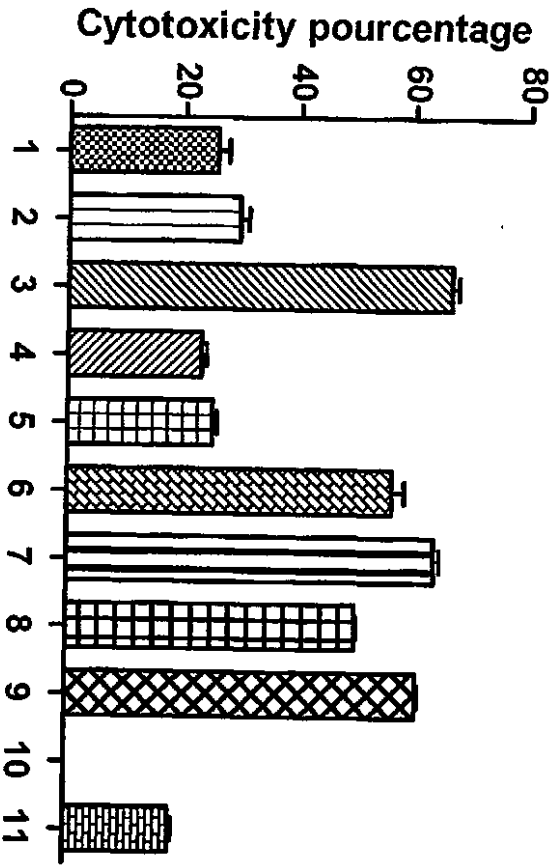


Figure 12

279

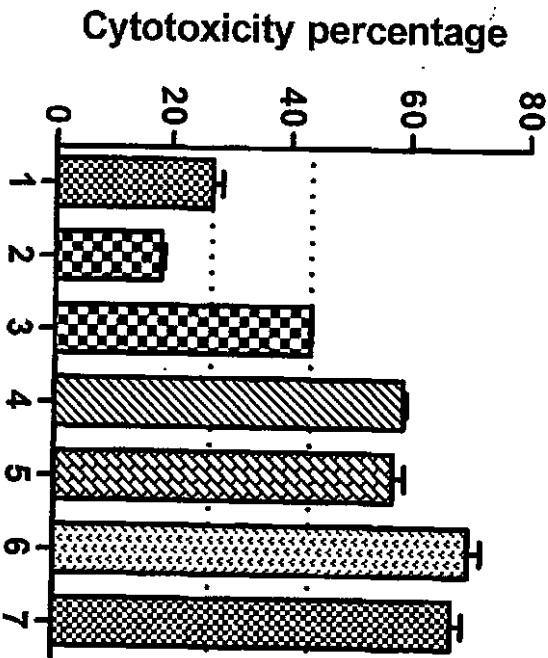


Figure 13

282

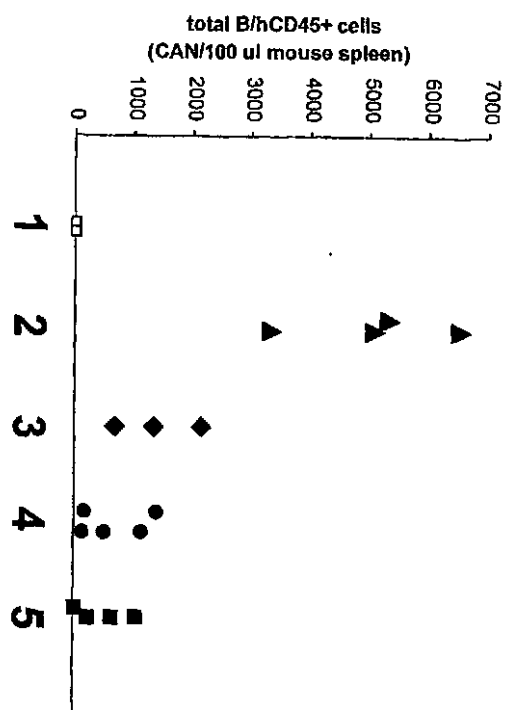


Figure 14

182

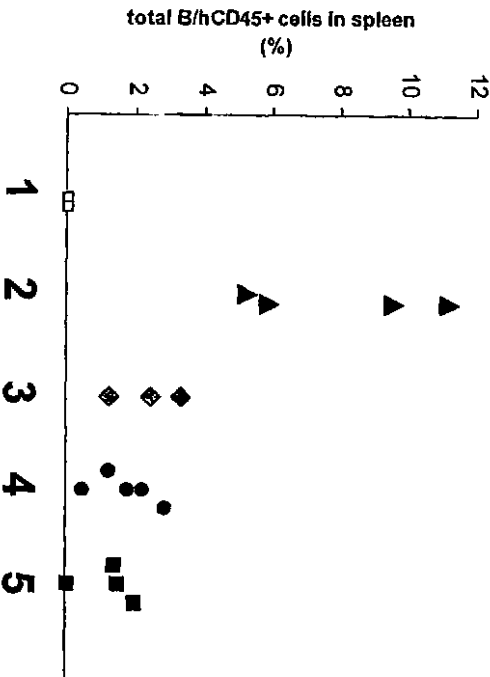


Figure 15

282

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0093726
		Bogotá D.C., Septiembre 23 de 2011 - 14:52:22

RECIBIDO DE : CASTILLO GRAU & ASOCIADOS LTDA.	NI 800.098.704
---	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	392736820	23/09/2011	571.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00 571.000.00
			===== \$571.000.00 =====

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

*** CONTINENTE ***

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-124710-00000-0000

Fecha: 2011-09-23 15:07:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 281



No. 11-124710-00000-0000

Fecha: 2011-09-23 15:07:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 282



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-124710-00000-0000

Fecha: 2011-09-23 15:07:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 282

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO

☐	Indicación que se solicita una patente
☐	Datos de identificación del solicitante
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-124710-00000-0000

Fecha: 2011-09-23 15:07:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 281

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	