



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04-17609

54. TITULO ANTICUERPO HUMANO INJERTADO EN UNA CDR
Y FRAGMENTO DE DICHO ANTICUERPO

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07A 1/36, A61K39/395.

71. SOLICITANTE KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

DOMICILIO TOKIO, JAPON

74. APODERADO HUMBERTO RUBIO CAMACHO

22. BOGOTA, D.C., FEBRERO 27 DE 2004

5

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04017609 00000000

Folios: 178

Fecha (GND): 2004-02-27 12:27:46

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI ALL PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Industria y Comercio

INDUSTRIA Y COMERCIO

04 017609 00

PETTORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

31-Marzo-2004

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I

☒ Capítulo II

SOLICITANTE
(71)
Nombre: **KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.** IDENTIFICACIÓN
Dirección: **6-1, Ohtemachi 1-chome Chiyoda-ku** C.C. ☐ NIT ☐
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** C.E. ☐ OTRO ☐
E-mail: Número
Domicilio: **TOKIO, JAPON**
Lugar de constitución: **TOKIO, JAPON**

REPRESENTANTE
(74)
Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 84, Of. 508** C.C. ☒ NIT ☐
O APODERADO Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** C.E. ☐ OTRO ☐
E-mail: No. 17192.082 T.P. 50.007 C&J

INVENTOR(ES)
(72)
Nombre: **Kenya SHITARA; Kazumasa NAKANURA;** IDENTIFICACIÓN
Emi HOSAKA; Akiko TANAKA; C.C. ☐ NIT ☐
Masamichi KOIKE C.E. ☐ OTRO ☐
Dirección: **JAPON** Número
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647**
E-mail:
Domicilio: **JAPON**

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/JP02/08828** Fecha **30 DE AGOSTO DE 2002**

Publicación Internacional No. **WO 03/018635** Fecha **06 DE MARZO DE 2003**

TITULO (54) "ANTICUERPO HUMANO INJERTADO EN UNA CDR Y FRAGMENTO DE DICHO ANTICUERPO"

Clasificación Internacional (51) **A61K39/395; A61P35/00**

Prioridad (33) País de origen (82) Fecha (31) Número de
solicitud

SI ☒ NO ☐ **JAPON** **31 DE AGOSTO DE 2001** **2001-265144**

Comprobante de pago No. **04 - 14,202** Fecha: **24 DE FEBRERO DE 2004**

2

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ 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 del 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 12 x 12
- ☐ 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)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA



C.C.

17'192.062 de Bogotá

T.P.

50.007 Consejo Superior de
La Judicatura


 Français 
 1 of 1

Images Description and Claims (25 Kb)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT
COOPERATION TREATY (PCT)

(11) WO 03/018635

(13) A1

(21) PCT/JP02/08828

(22) 30 August 2002 (30.08.2002)

(25) Japanese

(26) Japanese

(30) 2001-265144

31 August 2001

JP

(31.08.2001)

(43) 06 March 2003 (06.03.2003)

(51)⁷ C07K 16/28, C12N 5/10, 15/13, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00,
G01N 33/53

(54) HUMAN CDR-GRAFTED ANTIBODIES AND ANTIBODY FRAGMENTS
THEREOF

(71) KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. [JP/JP]; 6-1, Ohtemachi 1-chome,
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 (JP).

(71) 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP];
〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

(72) SHITARA, Kenya; c/o Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo
Co., Ltd., 6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-8533 (JP).
NAKAMURA, Kazuyasu; c/o Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko
Kogyo Co., Ltd., 6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-8533 (JP).
HOSAKA, Emi; c/o Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co.,
Ltd., 6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-8533 (JP). TANAKA,
Akiko; c/o Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 6-6,
Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-8533 (JP). KOIKE,
Masamichi; c/o Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.,
6-6, Asahimachi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-8533 (JP).

(72) 設楽 研也 (SHITARA, Kenya); 〒194-8533 東京都町田市旭町三丁目6番
6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 中村 和靖
(NAKAMURA, Kazuyasu); 〒194-8533 東京都町田市旭町三丁目6番6号
協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 保坂 絵美
(HOSAKA, Emi); 〒194-8533 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醸
酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 田中 晶子 (TANAKA, Akiko);
〒194-8533 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東
京研究所内 Tokyo (JP). 小池 正道 (KOIKE, Masamichi); 〒194-8533 東京

都 町田市 旭町三丁目 6 番 6 号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内
Tokyo (JP).

(74) OGURI, Shohei, et al; Eikoh Patent Office, 28th Floor, ARK Mori Building,
12-32, Akasaka 1-chome, Minato-ku, Tokyo 107-6028 (JP).

(74) 小栗 昌平 (OGURI, Shohei), et al; 〒107-6028 東京都 港区 赤坂一丁目 1 2
番 3 2 号 アーク森ビル 2 8 階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW

(84) ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

[For information on time limits for entry into the national phase please click here](#)

Published

— *with international search report*

(57) A human CDR-grafted antibody which specifically reacts with the extracellular region of human CC chemokine receptor 4 (CCR4) but shows no reactivity with human platelets or its antibody fragment; a human CDR-grafted antibody which specifically reacts with the extracellular region of human CC chemokine receptor 4 (CCR4) and shows cytotoxicity on cells expressing CCR4 or its antibody fragment; and drugs, remedies and diagnostics containing at least one member selected from these antibodies and antibody fragments as the active ingredient.



1 of 1

54

REGISTRO
PATENTE DE INVENCIÓN:
ANTICUERPO HUMANO
INJERTADO EN UNA CDR Y
FRAGMENTO DE DICHO
ANTICUERPO

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04017609 00000000 Folios: 176
Fecha (MM): 2004-02-27 12:27:46
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 14,202
FECHA : FEBRERO 24 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO CAMACHO	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	16826776	24/02/2004	4,829,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	422,000.00

SOM: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**ANTICUERPO HUMANO INJERTAD EN UNA CDR Y
FRAGMENTO DE DICHO ANTICUERPO**

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con la región extracelular del receptor 4 de la quimiocina CC humana (denominada en lo sucesivo "CCR4") pero que no reacciona con una plaqueta y el fragmento de dicho anticuerpo. Además, la presente invención se refiere a un anticuerpo humano injertado
- 10 en una CDR que reacciona específicamente con la región extracelular de CCR4 humana pero no tiene una actividad inhibidora de un ligando CCR4 como TARC o MDC que se une a CCR4, y al fragmento de dicho anticuerpo. Además, la presente invención se refiere a un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con la región extracelular de
- 15 CCR4, tiene una actividad citotóxica y una actividad inhibidora de la producción de citocinas por las células Th2 y contiene una región determinante de la complementariedad específica (denominada en lo sucesivo "CDR"), y al fragmento de dicho anticuerpo. Además, la presente invención se refiere a un ADN que codifica el anticuerpo, o el fragmento de
- 20 dicho anticuerpo. Además, la presente invención se refiere a un vector que comprende el ADN, y un transformante que se ha transformado con el vector. Además, la presente invención se refiere a un método para la producción del anticuerpo, o el fragmento de dicho anticuerpo usando el transformante, y un medicamento como un producto terapéutico, un producto para diagnóstico, y
- 25 similares, para enfermedades inmunes mediadas por Th2 como las enfermedades alérgicas, y similares, que comprende el uso del anticuerpo o el fragmento de dicho anticuerpo. Además, la presente invención se refiere a un medicamento como un producto terapéutico, un producto para

diagnóstico, y similares, para cánceres como cánceres hematológicos, por ejemplo, leucemia y linfomatosis, que comprende el uso del anticuerpo o el fragmento de dicho anticuerpo.

5 ANTECEDENTES

- Varios factores como los eosinófilos, los mastocitos, IgE, y similares, tienen una función en las enfermedades alérgicas como el asma bronquial. Los eosinófilos infiltran un territorio inflamatorio y liberan proteínas citotóxicas básicas como MBP (proteína básica mayor) o similares mediante
- 10 degranulación y los tejidos circundantes se dañan por tales proteínas citotóxicas básicas. Los mastocitos se unen a un complejo inmune con un antígeno con IgE que es producido por las células B y liberan histamina de forma que se induce una reacción alérgica inmediata. La reacción alérgica se controla mediante moléculas biológicamente funcionales como citocinas,
- 15 quimiocinas, y similares, que participan en la trasducción de la señal entre células. La IL-5 induce la diferenciación, supervivencia y degranulación de los eosinófilos. La IL-4 induce la activación de las células B y la producción de IgE. La IgE producida forma un complejo inmune con el antígeno y causa la degranulación de los mastocitos. Se ha demostrado que la IL-4, la IL-13, y
- 20 similares, también se producen por los mastocitos y contribuyen a la producción de IgE por las células B (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 152, 2059 (1995), *Immunol. Today*, 15, 19 (1994)). Por tanto, existe una red elaborada citocina-quimiocina entre las células inflamatorias y mantiene un equilibrio complicado.
- 25 Las citocinas y quimiocinas son producidas por las células T colaboradoras que expresan CD4 en la superficie celular (denominadas en lo sucesivo "células Th CD4+"). En realidad, se ha demostrado que existe una infiltración de las células T colaboradoras en el territorio inflamado en las vías respiratorias de los pacientes con asma bronquial, donde se activa un
- 30 número considerablemente grande de células T, y que la intensidad e hipersensibilidad de la vía respiratoria del paciente con asma se correlaciona

con el número de células T activadas, así como están también aumentadas las células T activadas en sangre periférica (*Am. Rev. Respir. Dis.*, 145, S22 (1992)).

5 Las células T colaboradoras se clasifican en células Th1 y células Th2, dependiendo de la clase de citocina que produce cada una (*Annu. Rev. Immunol.*, 7, 145 (1989)). Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-13, y similares. Las citocinas producidas por las células Th2 son las citocinas Th2.

10 Se ha demostrado que un clon de células T específico del antígeno aislado en un paciente que tiene una enfermedad atópica libera citocinas Th2 cuando se estimula *in vitro* (*Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 88, 4538 (1991)), y que las células Th2 se encuentran en el líquido de lavado broncoalveolar (denominado en lo sucesivo "BAL") y en la mucosa de las vías respiratorias de los pacientes con asma (*N. Engl. J. Med.*, 326, 298 (1992), *Eur. J. Immunol.*, 23, 1445 (1993)). Los niveles de expresión de los ARNm de IL-4 e
15 IL-5 de las citocinas Th2 están aumentados cuando se examina la expresión del ARNm de varias citocinas en las células del BAL usando un modelo animal de inflamación alérgica (*Clin. Immunol. Immunopathol.*, 75, 75 (1995)). Además, cuando las células Th2 se administran por vía intravenosa o intranasal a ratones se induce una inflamación asmática en los pulmones en
20 una forma específica del antígeno (*J. Exp. Med.*, 186, 1737 (1997), *J. Immunol.*, 160, 1378 (1998)) y se observa eosinofilia (*J. Immunol.*, 161, 3128 (1998)). La expresión de IL-5 se observa en la mucosa de las vías respiratorias de los pacientes con asma y en las lesiones cutáneas de los pacientes que tienen dermatitis atópica (*J. Clin. Invest.*, 87, 1541 (1991), *J. Exp. Med.*, 173, 775 (1991)), y el nivel de expresión de IL-5 en la mucosa de
25 la rinitis alérgica crónica se correlaciona con el nivel de expresión de IL-13 y con las cantidades de IgE sérica total y de IgE específica del antígeno (*Therapeutics*, 32, 19 (1998)).

30 Quimiocina es un término general que designa proteínas básicas de unión a heparina que inducen quimiotaxis y activación de los leucocitos, y se clasifican en subfamilias de CXC, CC, C y CX₃C dependiendo de la posición

de los residuos de cisteína en la estructura primaria. Hasta la fecha se han identificado 16 receptores de quimiocina (*Curr. Opin. Immunol.*, 11, 626 (1999)), y se ha demostrado que la expresión de cada receptor de quimiocina es diferente entre los leucocitos como las células Th1, Th2 y otros (*Cell Engineering*, 17, 1022 (1998)).

La CCR4 humana es una proteína G acoplada al receptor de transmembrana siete clonado como K5-5 a partir de una línea celular de basófilos inmaduros humanos KU-812. Se considera que las regiones de transmembrana de CCR4 se encuentran en las posiciones 40 a 67, posiciones 78 a 97, posiciones 113 a 133, posiciones 151 a 175, posiciones 207 a 226, posiciones 243 a 270 y posiciones 285 a 308 en la secuencia de aminoácidos, que las regiones extracelulares se encuentran en las posiciones 1 a 39, posiciones 98 a 112, posiciones 176 a 206 y posiciones 271 a 284 en la secuencia de aminoácidos, y que las regiones intracelulares se encuentran en las posiciones 68 a 77, posiciones 134 a 150, posiciones 227 a 242 y posiciones 309 a 360 en la secuencia de aminoácidos (*J. Biol. Chem.*, 270, 19495 (1995)). En primer lugar, se describió que el ligando de CCR4 es MIP-1 α (proteína inflamatoria de los macrófagos 1 α), RANTES (regulada al activarse las células T normales expresadas y secretadas) o MCP-1 (proteína quimiotáctica de los monocitos) (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 218, 337 (1996), WO 96/23068). Sin embargo, se ha demostrado que la TARC (una quimiocina regulada por el timo y la activación) producida por las células mononucleadas estimuladas en sangre periférica humana (denominadas en lo sucesivo "PBMC") y células del timo (*J. Biol. Chem.*, 271, 21514 (1996)) específicamente se une a CCR4 (*J. Biol. Chem.*, 272, 15036 (1997)). También se ha publicado que la MDC (quimiocina derivada de los macrófagos) aislada de macrófagos (*J. Exp. Med.*, 185, 1595 (1997)), también conocida como STCP-1 (proteína quimiotáctica 1 de células T estimuladas) (*J. Biol. Chem.*, 272, 25229 (1997)), se une a la CCR4 con mayor fuerza que la TARC (*J. Biol. Chem.*, 273, 1764 (1998)).

Se ha demostrado que la CCR4 se expresa en células Th CD4+ que

producen citocina y/o quimiocina (*J. Biol Chem.*, 272, 15036 (1997)), y se ha descrito que la CCR4 se expresa selectivamente en células Th2 entre las células Th CD4+ (*J. Exp. Med.*, 187, 129 (1998), *J. Immunol.*, 161, 5111 (1998)). Además, se han encontrado las células CCR4+ en las células T efectoras o memoria (CD4+/CD45RO+), y cuando se estimulaban las células CCR4+ se producían IL-4 e IL-5 pero no se producía IFN- γ (*Int. Immunol.*, 11, 81 (1999)). Además, se ha descrito que las células CCR4+ pertenecen a un grupo positivo a CLA (antígeno de linfocitos cutáneos) y negativo a integrina $\alpha 4 \beta 8$ entre las células T memoria, y que la CCR4 se expresa en células T memoria pero no en relación con la inmunidad intestinal sino con la inmunidad sistémica de la piel y otros territorios (*Nature*, 400, 776 (1999)). Estos resultados indican firmemente que cuando se induce la inflamación se activan las células T memoria para expresar CCR4 y que migran hacia el territorio inflamatorio mediante MDC y TARC de los ligandos de CCR4, y que aceleran la activación de otras células inflamatorias.

Recientemente, se ha demostrado que la CCR4 también se expresa en las células citolíticas naturales (*Journal of Immunology*, 164, 4048-4054 (2000), *Blood*, 97, 367-375 (2001)) y plaquetas (*Thrombosis Research*, 101, 279-289 (2001), *Blood*, 96, 4046-4054 (2000), *Blood*, 97, 937-945 (2001)) en el hombre.

Se sabe que un antagonista de TARC o MDC como un ligando de CCR4, es decir, un antagonista de la CCR4, inhibe la agregación plaquetaria (WO 99/15686). Se sabe que una sustancia de este tipo que modula la función de la CCR4 también afecta a las funciones plaquetarias.

La expresión de la CCR4 se encuentra en las plaquetas. Por ejemplo, Adrian *et al.* (*Blood*, 97, 937-945 (2001)) y Abi-Younes *et al.* (*Thrombosis Research*, 101, 279-289 (2001), WO 00/42074, WO 00/41724) han detectado la expresión de CCR4 en plaquetas humanas usando anticuerpos anti-CCR4. Hasta la fecha, no se conoce un anticuerpo que reaccione frente a CCR4 pero que no sea capaz de unirse a las plaquetas humanas.

Además, se sabe que cuando se produce un autoanticuerpo capaz de

unirse a las plaquetas se induce una trombopenia autoinmune (*Blood*, 70, 428-431 (1987), *Transfusion Science*, 19, 245-251 (1998)). En general, los fármacos que influyen sobre la trombocitopenia y las funciones plaquetarias no son deseables como medicamentos porque a menudo provocan efectos secundarios graves como hemorragias y formación de trombos. En particular, como los anticuerpos tienen una semivida prolongada, es difícil desarrollar como medicamento un anticuerpo que afecte a las funciones plaquetarias. Por ejemplo, se ha suspendido el desarrollo como fármaco de un anticuerpo antiligando CD40 para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes por la generación de efectos secundarios que se consideran debidos al reconocimiento de un antígeno expresado en las plaquetas activadas (*Nature Medicine*, 6, 114 (2000), *BioCentury*, A8 de 18 (2002.06.20)).

Se sabe que las proteínas están sujetas a varias reacciones de modificación después de su traducción. Una de las reacciones de modificación conocidas es una reacción de sulfatación de los residuos tirosina. Se ha descrito que muchas proteínas se sulfatan en los residuos tirosina (*Chemistry and Biology*, 7, R57-R61 (2000)). El residuo tirosina que se sulfata tiene la característica de que se encuentran muchos residuos de aminoácidos en su vecindad, y se ha sugerido una proteína que tiene la posibilidad de ser sulfatada y su región (*Cell*, 98, 667-676 (1999)). Con respecto a la CCR4, se encuentran 4 residuos tirosina cerca del N-terminal, pero no hay publicaciones que demuestran que los residuos tirosina estén sulfatados.

Se han desarrollado los siguientes métodos actuales para el tratamiento de las enfermedades inmunes mediadas por Th2: (1) antagonistas de citocinas y quimiocinas como un anticuerpo humanizado anti-IL-5 (SB-240563: Smith Kline Beecham, Sch-55700 (CDP-835): Shehling Plough/Celltech), un anticuerpo humanizado IL-4 (Patente de los EE.UU. 5.914.110), un receptor soluble de quimiocina (*J. Immunol.*, 160, 624 (1998)), y similares; (2) inhibidores de la producción de citocinas o quimiocinas como un inhibidor de la producción de IL-5 (Solicitud de Patente Japonesa

Publicada no Examinada N° 53355/96), un antagonista retinoide (WO 99/24024), tosilato de espiplatol (IPD-1151T, fabricado por Taiho Pharmaceutical), y similares; (3) fármacos que actúan sobre los eosinófilos, mastocitos, y similares, como células inflamatorias finales, como un anticuerpo humanizado frente al receptor de IL-5 (WO 97/10354), un antagonista del receptor de la quimiocina CC3 (CCR3) (Solicitud de Patente Japonesa Publicada no Examinada N° 147872/99), y similares; (4) inhibidores de las moléculas inflamatorias como un anticuerpo humanizado anti-IgE (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157, 1429 (1998)), etc.; y similares, pero inhiben sólo una parte de la red elaborada entre citocinas, quimiocinas y células inflamatorias. Las enfermedades inmunes mediadas por Th2 no se deberían curar con este tipo de fármacos. Los anticuerpos anti-CD4 tienen una actividad de control de las células T y tienen efectos sobre el asma grave dependiente de esteroides. Sin embargo, como la molécula de CD4 se expresa abundantemente en varias células inmunes, carece de especificidad y tiene el inconveniente de acompañarse de un efecto inmunosupresor importante (*Int. Arch. All. Immunol.*, 118, 133 (1999)).

Por tanto, para inhibir todos los mediadores se requiere controlar específicamente las reacciones previas de la reacción alérgica problemática, es decir, las células Th2.

El método que se usa actualmente para el tratamiento de los pacientes que tienen enfermedades inmunes graves mediadas por Th2 es la administración de esteroides, pero sus efectos secundarios no se pueden evitar. Además, existen los inconvenientes de que las afecciones de los pacientes vuelven al estado previo cuando se suspende la administración del esteroide y de que se adquiere la resistencia al fármaco cuando el esteroide se administra durante un tiempo prolongado.

Hasta la fecha, no se ha establecido ningún anticuerpo humano injertado en una CDR, ni fragmento de dicho anticuerpo, que puedan detectar las células que expresan CCR4 y que también tengan citotoxicidad frente a las células que expresan CCR4. Además, tampoco se conoce ningún

producto terapéutico que pueda inhibir la producción de citocinas Th2.

Aunque se ha descrito que la CCR4 también se expresa en las células cancerosas de pacientes con leucemia (*Blood*, 96, 685 (2000)), no se conoce ningún producto terapéutico que deplecione las células de leucemia.

5 En general, se sabe que cuando se administra al hombre un anticuerpo derivado de un animal no humano como, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se reconoce como una sustancia extraña e induce un anticuerpo humano frente al anticuerpo de ratón (anticuerpo humano antirratón: denominado en lo sucesivo "HAMA") en el cuerpo humano. Se
10 sabe que los anticuerpos HAMA reaccionan con el anticuerpo de ratón administrado provocando efectos secundarios (*J. Clin. Oncol.*, 2, 881 (1984), *Blood*, 65, 1349 (1985), *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 932 (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 1242 (1985)) para acelerar la desaparición del anticuerpo de ratón administrado del cuerpo (*J. Nucl. Med.*, 26, 1011 (1985),
15 *Blood*, 65, 1349 (1985), *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 937 (1988)) y reducir los efectos terapéuticos del anticuerpo de ratón (*J. Immunol.*, 135, 1530 (1985), *Cancer Res.*, 46, 6489 (1986)).

Para solucionar estos problemas se ha intentado convertir un anticuerpo derivado de un animal no humano en un anticuerpo humano
20 injertado en una CDR usando una técnica de ingeniería genética.

El anticuerpo humano injertado en una CDR es un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de CDR en la región variable (denominada en lo sucesivo "región V") derivada de un anticuerpo animal no humano se
25 injerta en una posición apropiada en un anticuerpo humano (*Nature*, 321, 522 (1986)). En comparación con los anticuerpos derivados de los animales no humanos como los anticuerpos de ratón, y similares, estos anticuerpos humanos injertados en una CDR tienen varias ventajas para aplicaciones clínicas en el hombre. Por ejemplo, se ha descrito que su inmunogenicidad se redujo y su semivida se prolongó comparada con un anticuerpo de ratón
30 usando un mono (*Cancer Res.*, 56, 1118 (1996), *Immunol.*, 85, 668 (1995)). Por tanto, se espera que los anticuerpos humanos injertados en una CDR

tengan menos efectos secundarios en el hombre y que sus efectos terapéuticos continúen durante un período de tiempo más prolongado que los anticuerpos derivados de animales no humanos.

Además, como el anticuerpo humano injertado en una CDR se prepara
5 utilizando una técnica de ingeniería genética, se pueden preparar las moléculas de distintas formas. Por ejemplo, cuando se usa la subclase $\gamma 1$ como la región constante (denominada en lo sucesivo "región C") de una cadena pesada (denominada en lo sucesivo "cadena H") (la región C de la cadena H se denominará "CH") de un anticuerpo humano, se puede preparar
10 un anticuerpo humanizado que tiene una función efectora alta como actividad citotóxica mediada por células y dependiente del anticuerpo (denominada en lo sucesivo "ADCC") (*Cancer Res.*, 56, 1118 (1996)) y se espera una semivida prolongada en sangre comparada con la del anticuerpo de ratón (*Immunol.*, 95, 668 (1995)). Además, en el tratamiento dirigido en particular a
15 reducir el número de células que expresan CCR4, para conseguir los efectos terapéuticos es importante disponer de actividades citotóxicas más altas como la actividad citotóxica dependiente del complemento (denominada en lo sucesivo "actividad CDC") y de una actividad ADCC a través de la región Fc (la región que se encuentra en la región bisagra y después de ella en una
20 cadena pesada del anticuerpo). Por lo tanto, estos resultados demuestran claramente que los anticuerpos humanos injertados en una CDR se prefieren a los anticuerpos derivados de los animales no humanos como son los anticuerpos de ratón.

Además, según los últimos avances producidos en la ingeniería de
25 proteínas y en la ingeniería genética, se puede preparar un fragmento del anticuerpo que tiene un peso molecular menor como Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo de cadena sencilla (denominado en lo sucesivo "scFv") (*Science*, 242, 423 (1988)), un fragmento dimerizado de la región V (denominado en lo sucesivo "Diabody") (*Nature Biotechnol.*, 15, 629 (1997)), un fragmento
30 estabilizado con disulfuro de la región V (denominado en lo sucesivo "dsFv") (*Molecular Immunol.*, 32, 249 (1995)), un péptido que contiene CDR (*J. Biol.*

Chem., 271, 2966 (1996)), etc., como anticuerpos humanos injertados en una CDR. Los fragmentos de anticuerpo tienen una actividad transicional excelente en los tejidos diana comparados con las moléculas de anticuerpo completas (*Cancer Res.*, 52, 3402 (1992)).

5 También se considera que es más deseable disponer de estos fragmentos derivados de los anticuerpos humanos injertados en una CDR y los fragmentos de dichos anticuerpos que de los que derivan de anticuerpos procedentes de animales no humanos como son los anticuerpos de ratón, cuando se usan en aplicaciones clínicas en el hombre.

10 Tal como se ha descrito anteriormente, se pueden esperar efectos diagnósticos y terapéuticos de los anticuerpos humanos injertados en una CDR y de fragmentos de dichos anticuerpos cuando se usen solos, pero se ha intentado mejorar aún más los efectos utilizando otras moléculas en combinación. Por ejemplo, se puede usar una citocina como una de estas
15 moléculas. Citocina es un término general que se refiere a varios factores solubles que controlan las funciones intercelulares mutuas en las reacciones inmunes. Por ejemplo, se sabe que la actividad CDC y la actividad ADCC son las actividades citotóxicas de los anticuerpos, y que la actividad ADCC se controla mediante células efectoras que tienen receptores Fc en la superficie
20 celular como monocitos, macrófagos, células NK, y similares. (*J. Immunol.*, 138, 1992 (1987)). Como varias citocinas activan estas células efectoras, se pueden administrar en combinación con un anticuerpo para mejorar la actividad ADCC del anticuerpo.

25 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a las siguientes descripciones (1) a (59).

(1) Un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con una región extracelular del receptor 4 de la quimiocina
30 CC humana (CCR4) pero que no reacciona con una plaqueta humana, o el fragmento de dicho anticuerpo.

(2) Un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con una región extracelular del receptor 4 de la quimiocina CC humana (CCR4) y que tiene una actividad citotóxica frente a una célula que expresa CCR4, o el fragmento de dicho anticuerpo

5 (3) El anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según la descripción (1), que tiene una actividad citotóxica frente a una célula que expresa CCR4.

(4) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (3), en el cual
10 la región extracelular es una región extracelular seleccionada entre el grupo formado por las posiciones 1 a 39, 98 a 112, 176 a 206 y 271 a 284 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48.

(5) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (4), en el cual
15 la región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 2 a 29 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48.

(6) El anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las descripciones (1) a (5), en el cual la región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 13 a 29 en la
20 secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48.

(7) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (6), en el cual la región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 13 a 25 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48.

25 (8) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (7), que reacciona específicamente con una célula que expresa CCR4.

(9) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (8), que tiene
30 una actividad citotóxica mayor frente a una célula que expresa CCR4 que un anticuerpo monoclonal producido por hibridoma de un animal no humano.

(10) El anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las descripciones (2) a (9), en el cual la actividad citotóxica es una actividad citotóxica mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC).

5 (11) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según la descripción (10), en el cual la actividad ADCC es una actividad de inducción de apoptosis de una célula que expresa CCR4.

10 (12) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (11), que tiene una actividad de depleción de una célula que expresa CCR4.

(13) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (8) a (12), en el cual la célula que expresa CCR4 es una célula Th2.

15 (14) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (13), que tiene una actividad de inhibición de la producción de citocinas de una célula Th2.

(15) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según la descripción (14), en el cual la citocina es IL-4, IL-5 o IL-13.

20 (16) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (15), que pertenece a un anticuerpo IgG humano.

25 (17) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (16), que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) y una región V de una cadena ligera (cadena L) de un anticuerpo monoclonal frente a CCR4.

30 (18) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (17), que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) y una región V

de una cadena ligera (cadena L) de un anticuerpo monoclonal frente a CCR4, y estructuras rígidas (FR) de la región V de la cadena H y de la región V de la cadena L de un anticuerpo humano.

(19) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (18), que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) y la región V de una cadena ligera (cadena L) de un anticuerpo monoclonal frente a CCR4, estructuras rígidas (FR) de la región V de la cadena H y de la región V de la cadena L de un anticuerpo humano, y la región constante (región C) de la cadena H y la región C de la cadena L de un anticuerpo humano.

(20) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (19), que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 1, 2 y 3, respectivamente.

(21) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (20), que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de una región variable (región V) de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 5, 6 y 7, respectivamente.

(22) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (21), que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 1, 2 y 3, respectivamente, y la región determinante de la complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de una región V de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que tiene las secuencias de

aminóácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 5, 6 y 7, respectivamente.

5 (23) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (22), que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ala en la posición 40, Gly en la posición 42, Lys en la posición 43, Gly en la posición 44, Lys en la posición 76 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 4 se sustituye por otro aminoácido.

10 (24) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (22), que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Thr en la posición 28 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 38 se sustituye por otro aminoácido.

20 (25) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (24), que contiene una región variable (región V) de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8 se sustituye por otro aminoácido.

30 (26) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (23) y (25), que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ala en la posición 40, Gly en la posición 42, Lys en la posición 43, Gly en la posición 44, Lys en la

posición 76 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 4 se sustituye por otro residuo de aminoácido; y una región V de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8 se sustituye por otro residuo de aminoácido.

(27) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (22), (24) y (25), que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Thr en la posición 28 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 38 se sustituye por otro residuo de aminoácido; y una región V de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8 se sustituye por otro residuo de aminoácido.

(28) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (22) y (25), que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 4, 9, 10, 11, 38, 39, 40 o 41.

(29) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (24) y (28), que comprende una región variable (región V) de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8, 12, 13 ó 14.

(30) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (22), que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 4, 9, 10, 11, 38, 39, 40 ó 41; y una región V de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8, 12, 13 ó 14.

(31) El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (22), que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 9 ó 10; y una región V de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 14.

(32) El fragmento del anticuerpo según cualquiera de las descripciones (1) a (31), en el cual el fragmento del anticuerpo es un fragmento del anticuerpo seleccionado entre Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un fragmento dimerizado (Diabody) de la región variable (región V), un fragmento estabilizado con disulfuro de la región V (dsFv) y un péptido que contiene una región determinante de la complementariedad (CDR).

(33) Un anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, que es producido por un transformante KM8759 (FERM BP-8129) o KM8760 (FERM BP-8130).

(34) Un transformante que produce el anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (33).

(35) El transformante según la descripción (34), en el cual el transformante es KM8759 (FERM BP-8129) o KM8760 (FERM BP-8130).

(36) Un proceso para la producción de un transformante capaz de producir el anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho

anticuerpo según cualquiera de las descripciones (1) a (33), que comprende el cultivo del transformante según la descripción (34) o (35) en un medio para formar y acumular el anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo en el cultivo; y la recuperación del anticuerpo o el fragmento del anticuerpo del cultivo.

(37) Un anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo en el que el anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (33) se conjuga químicamente o genéticamente con un radioisótopo, una proteína o un fármaco.

(38) Un ADN que codifica el anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las descripciones (1) a (33).

(39) Un vector recombinante que comprende el ADN según la descripción (38).

(40) Un transformante que se puede obtener por la introducción del vector recombinante según la descripción (39) en una célula huésped.

(41) Un medicamento que comprende al menos un componente seleccionado entre el anticuerpo humano injertado en una CDR, y el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (33) y (37) como un principio activo.

(42) Un producto terapéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con CCR4, que comprende al menos un componente seleccionado entre el anticuerpo humano injertado en una CDR, y el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (33) y (37) como un principio activo.

(43) El producto terapéutico según la descripción (42), en el cual la enfermedad relacionada con CCR4 es un cáncer o enfermedades inflamatorias.

(44) El producto terapéutico según la descripción (43), en el cual el cáncer es un cáncer hematológico.

(45) El producto terapéutico según la descripción (44), en el cual el cáncer hematológico es leucemia o linfomatosis.

5 (46) El producto terapéutico según la descripción (43), en el cual la enfermedad inflamatoria es una hipersensibilidad de las vías respiratorias o asma bronquial agudas o crónicas, enfermedad atópica cutánea, rinitis alérgica o polinosis.

10 (47) Un producto para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con CCR4, que comprende al menos un componente seleccionado entre el anticuerpo humano injertado en una CDR, y el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (33) y (37) como un principio activo.

(48) El producto para diagnóstico según la descripción (47), en el cual la enfermedad relacionada con CCR4 es un cáncer o una enfermedad inflamatoria.

15 (49) El producto para diagnóstico según la descripción (48), en el cual el cáncer es un cáncer hematológico.

(50) El producto para diagnóstico según la descripción (48), en el cual el cáncer hematológico es leucemia o linfomatosis.

20 (51) El producto para diagnóstico según la descripción (48), en el cual la enfermedad inflamatoria es asma crónica por hipersensibilidad de las vías respiratorias, asma bronquial, enfermedad atópica cutánea, rinitis alérgica o polinosis.

25 (52) Un producto terapéutico para el tratamiento de enfermedades inmunes mediadas por Th2, que contiene al menos un componente seleccionado entre el anticuerpo humano injertado en una CDR y el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las descripciones (1) a (33) y (37) como un principio activo.

30 (53) El producto terapéutico según la descripción (52), en el cual la enfermedad inmune mediada por Th2 es asma crónica por hipersensibilidad de las vías respiratorias, asma bronquial, enfermedad atópica cutánea, rinitis alérgica o polinosis.

(54) Un producto para el diagnóstico de enfermedades inmunes mediadas por Th2, que contiene al menos un componente seleccionado entre el anticuerpo humano injertado en una CDR y el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las descripciones (1) a (33) y (37) como un principio activo.

(55) El producto para diagnóstico según la descripción (54), en el cual la enfermedad inmune mediada por Th2 es asma crónica por hipersensibilidad de las vías respiratorias, asma bronquial, enfermedad atópica cutánea, rinitis alérgica o polinosis.

(56) Un método la detección inmunológica de CCR4, que usa el anticuerpo humano injertado en una CDR y el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las descripciones (1) a (33) y (37).

(57) Un método la detección inmunológica de una célula que expresaba CCR4 en la superficie celular, que comprende el uso del anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las descripciones (1) a (33) y (37).

(58) Un método para reducir o deplecionar una célula que expresaba CCR4 en la superficie celular, que comprende el uso del anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las descripciones (1) a (33) y (37).

(59) Un método para inhibir la producción de citocinas de una célula Th2, que comprende el uso del anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las descripciones (1) a (33) y (37).

En la presente invención, las enfermedades relacionadas con CCR4 incluyen cánceres, enfermedades inflamatorias, y similares.

En la presente invención, los cánceres incluyen cánceres hematológicos, particularmente leucemia, linfomatosis, y similares.

En la presente invención, las enfermedades inflamatorias incluyen hipersensibilidad de las vías respiratorias o asma bronquial agudas o crónicas, enfermedades atópicas cutáneas como dermatitis atópica, rinitis

alérgica, polinosis, y similares.

En la presente invención, las enfermedades inmunes mediadas por Th2 pueden ser cualquier enfermedad inmune con la que esté relacionada la célula Th2, e incluyen hipersensibilidad de las vías respiratorias o asma bronquial agudas o crónicas, enfermedades atópicas cutáneas como dermatitis atópica, rinitis alérgica, polinosis, neumonía intersticial, fibrosis pulmonar, enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, y similares.

El anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con CCR4 (anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR) y un fragmento de dicho anticuerpo de la presente invención (en lo sucesivo, ambos se denominarán habitualmente como el anticuerpo de la presente invención, en algunos casos) no están limitados mientras se trate de un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con la región extracelular de la CCR4 humana pero que no reacciona con una plaqueta humana o un fragmento de dicho anticuerpo. El término "no reacciona con una plaqueta humana" significa que el anticuerpo no muestra sustancialmente ninguna actividad de unión a una plaqueta humana. Específicamente, significa que no se demuestra la actividad de unión cuando se mide en un citómetro de flujo.

Además, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que reacciona específicamente con la región extracelular de la CCR4 humana y tiene una actividad citotóxica para células que expresan CCR4.

La actividad citotóxica incluye actividad CDC y actividad ADCC.

Además, el anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos que reaccionan específicamente con preferiblemente una región que contiene posiciones 1 a 39, 98 a 112, 176 a 206 ó 271 a 284 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48, más preferiblemente una región que contiene posiciones 2 a 29 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48 (N° de ID de la SEC.: 36), aún más preferiblemente una región que contiene posiciones 12 a

29 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48 (N° de ID de la SEC.: 37), y más preferiblemente una región que contiene posiciones 12 a 25 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48.

5 El anticuerpo humano injertado en una CDR representa un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de CDR de las VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano se injertan en las posiciones apropiadas de las VH y VL de un anticuerpo humano.

10 El anticuerpo humano injertado en una CDR de la presente invención se puede producir construyendo ADNc que codifiquen las regiones V en que las secuencias de aminoácidos de la CDR de las VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, que reacciona específicamente con CCR4, son injertados en la FR de VH y VL en un anticuerpo humano, insertándoles respectivamente en un vector de expresión para una célula
15 animal que tiene un ADN que codifica la CH y la región C de la cadena H (denominadas en lo sucesivo "CL") de un anticuerpo humano para construir un vector de expresión de un anticuerpo humano injertado en una CDR, y a continuación introducirlo en una célula animal para expresar el anticuerpo humano injertado en una CDR.

20 Como método para seleccionar las secuencias de aminoácidos de la FR de una VH y una VL de un anticuerpo humano, se puede usar cualquier método, siempre que deriven de anticuerpos humanos. Ejemplos pueden ser las secuencias de aminoácidos de la FR de una VH y una VL en anticuerpos humanos registrados en bases de datos como Protein Data Bank, etc., o las
25 secuencias de aminoácidos comunes de cada subgrupo de FR de una VH y una VL en anticuerpos humanos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991).

Se puede usar cualquier CH en el anticuerpo de la presente invención, mientras pertenezca a una inmunoglobulina humana (denominada en lo
30 sucesivo "hlg"). Preferiblemente, se puede usar una clase de hlgG, y cualquiera de las subclases $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$ pertenecientes a la clase de hlgG.

Además, se puede usar cualquier CL en el anticuerpo humano injertado en una CDR, siempre que pertenezca a las clases κ o λ .

El anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos humanos injertados en una CDR o los fragmentos de anticuerpo de los mismos que
5 contienen anticuerpo HV CDR1, CDR2 y CDR3 que contiene las secuencias de aminoácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 1, 2 y 3, respectivamente, y/o VL CDR1, CDR2 y CDR3 que contiene las secuencias de aminoácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 5, 6 y 7, respectivamente.

10 Ejemplos preferidos incluyen anticuerpos humanos injertados en una CDR donde la VH en el anticuerpo contiene la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 4 ó 38 y/o la VL contiene la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8.

Ejemplos más preferidos incluyen:

15 un anticuerpo humano injertado en una CDR que contiene VH en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ala en la posición 40, Gly en la posición 42, Lys en la posición 43, Gly en la posición 44, Lys en la posición 76 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos
20 representada por el N° de ID de la SEC.: 4 se sustituye por otro residuo de aminoácido,

un anticuerpo humano injertado en una CDR que contiene VH en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Thr en la posición 28 y
25 Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 38 se sustituye por otro residuo de aminoácido,

un anticuerpo humano injertado en una CDR que contiene VL en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ile en la posición 2, Val
30 en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8 se sustituye por

un residuo de aminoácido,

un anticuerpo humano injertado en una CDR que contiene VH en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ala en la posición 40, Gly en la posición 42, Lys en la posición 43, Gly en la posición 44, Lys en la posición 76 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 4 se sustituye por otro residuo de aminoácido; y VL en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8 se sustituye por otro residuo de aminoácido,

un anticuerpo humano injertado en una CDR que comprende VH en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Thr en la posición 28 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 38 se sustituye por otro residuo de aminoácido; y VL en la VL del anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8 se sustituye por otro residuo de aminoácido, y similares.

La presente invención incluye anticuerpos que comprenden la secuencia de aminoácidos en que uno o más aminoácidos se borran, sustituyen, insertan o añaden y reaccionan específicamente con CCR4 como se ha descrito anteriormente, y los fragmentos de anticuerpo de los mismos.

En la presente invención, borrar, sustituir, insertar o añadir uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos significa que uno o más aminoácidos se borran, sustituyen, insertan o añaden a una o más posiciones en la secuencia de aminoácidos. El borrado, sustitución, inserción y/o adición se pueden causar en la misma secuencia de aminoácidos

simultáneamente. Además, el residuo de aminoácido sustituido, insertado o añadido puede ser natural o no natural. El residuo natural de aminoácido puede ser L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-
5 fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, L-cisteína, y similares.

A continuación, se muestran ejemplos preferidos de residuos de aminoácidos que se sustituyen entre sí. Los residuos de aminoácidos del
10 mismo grupo se pueden sustituir entre sí.

Grupo A:

Leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, O-metilserina, t-butilglicina, t-butilalanina,
15 ciclohexilalanina;

Grupo B:

Ácido aspártico, ácido glutámico, ácido isoaspártico, ácido isoglutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido 2-aminosubérico;

Grupo C:

20 Asparagina, glutamina;

Grupo D:

Lisina, arginina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico;

Grupo E:

25 Prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina;

Grupo F:

Serina, treonina, homoserina;

Grupo G:

Fenilalanina, tirosina.

30 El fragmento del anticuerpo de la presente invención incluye Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Diabody, dsFv, un péptido que contiene CDR, y similares.

Un Fab es un fragmento del anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y una actividad de unión al antígeno, en el que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y toda la cadena L, entre los fragmentos obtenidos por el tratamiento de IgG con una
5 proteasa, papaína (cortando un residuo de aminoácido en la posición 224 de la cadena H), se unen a través de un enlace disulfuro.

El Fab de la presente invención se puede obtener mediante el tratamiento de un anticuerpo humano injertado en una CDR de la presente invención que reacciona específicamente con CCR4, con una proteasa,
10 papaína. Además, el Fab se puede producir por la inserción de un ADN que codifica el Fab del anticuerpo en un vector de expresión de células procariotas o un vector de expresión de células eucariotas, y la introducción del vector en células procariotas o células eucariotas para expresar el Fab.

Un $F(ab')_2$ es un fragmento del anticuerpo que tiene un peso molecular
15 de aproximadamente 100.000 y una actividad de unión al antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido mediante un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos mediante el tratamiento de IgG con una proteasa, pepsina.

El $F(ab')_2$ de la presente invención se puede obtener mediante el
20 tratamiento de un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con CCR4, con una proteasa, pepsina. Además, el $F(ab')_2$ se puede producir por la unión del Fab' descrito a continuación mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

Un Fab' es un fragmento del anticuerpo que tiene un peso molecular
25 de aproximadamente 50.000 y una actividad de unión al antígeno, que se obtiene por escisión de un enlace disulfuro en la región bisagra del $F(ab')_2$.

El Fab' de la presente invención se puede obtener mediante el
tratamiento del $F(ab')_2$ que reacciona específicamente con CCR4, con un agente reductor, ditiotretol. Además, el Fab' de la presente invención se
30 puede producir por la inserción de un ADN que codifica un Fab' de un anticuerpo humano injertado en una CDR de la presente invención que

reacciona específicamente con CCR4 en un vector de expresión de células procariotas o un vector de expresión de células eucariotas, y la introducción del vector en células procariotas o células eucariotas para expresar el Fab'.

Un scFv es a un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH en el que una cadena
5 VH y una cadena VL se unen usando un ligante peptídico apropiado (P) de 12 o más residuos y que tiene actividad de unión al antígeno.

El scFv de la presente invención se puede producir obteniendo ADNc que codifican una VH y una VL de un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con CCR4 de la presente invención,
10 construyendo un ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión de células procariotas o un vector de expresión de células eucariotas, e introduciendo después el vector de expresión en células procariotas o células eucariotas para expresar el scFv.

Un diabody es un fragmento del anticuerpo en el que el scFv's que
15 tiene una especificidad de unión al antígeno igual o diferente forma un dímero y tiene una actividad de unión al antígeno divalente frente al mismo antígeno o dos actividades de unión al antígeno frente a diferentes antígenos.

El diabody de la presente invención, por ejemplo, un diabody divalente
20 que reacciona específicamente con CCR4, se puede producir obteniendo ADNc que codifican una VH y una VL de un anticuerpo que reacciona específicamente con CCR4, construyendo un ADN que codifica el scFv que tiene un ligante polipeptídico de 3 a 10 residuos, insertando el ADN en un vector de expresión de células procariotas o un vector de expresión de
25 células eucariotas, e introduciendo después el vector de expresión en células procariotas o células eucariotas para expresar el diabody.

Un dsFV se obtiene por la unión de polipéptidos en los que un residuo de aminoácido de cada una de la VH y de la VL se sustituye por un residuo cisteína mediante un enlace disulfuro entre los residuos cisteína. El residuo
30 de aminoácido que se sustituye por un residuo cisteína se puede seleccionar a partir de una estimación de la estructura tridimensional del anticuerpo de

acuerdo con el método demostrado por Reiter *et al.* (*Protein Engineering*, **7**, 697 (1994)).

El dsFv de la presente invención se puede producir obteniendo ADNc que codifican una VH y una VL de un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con CCR4 de la presente invención, construyendo un ADN que codifica el dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión de células procariotas o un vector de expresión de células eucariotas, e introduciendo después el vector de expresión en células procariotas o células eucariotas para expresar el dsFv.

Un péptido que contiene CDR se produce por la inclusión de al menos una región de los CDR de las cadenas H y L. Varios CDR se pueden unir directamente o mediante un ligante peptídico apropiado.

El péptido que contiene CDR de la presente invención se puede producir obteniendo el ADNc que codifica la CDR de VH y VL de un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con CCR4, construyendo el ADN que codifica CDR, insertando el ADN en un vector de expresión de células procariotas o un vector de expresión de células eucariotas, y la posterior introducción del vector de expresión en células procariotas o células eucariotas para expresar el péptido. Además, el péptido que contiene la CDR también se puede producir por un método de síntesis química, como un método Fmoc (método con fluorenilmetoxycarbonilo), un método tBoc (método con t-butiloxycarbonilo), y similares.

El anticuerpo de la presente invención incluye derivados del anticuerpo en los que un radioisótopo, una proteína, un fármaco, y similares, están químicamente o genéticamente conjugados con el anticuerpo de la presente invención.

Los derivados del anticuerpo de la presente invención se pueden producir por la conjugación química de un radioisótopo, una proteína o un fármaco en el lado N-terminal o C-terminal de una cadena H o una cadena L de un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que reacciona específicamente

con CCR4, a un grupo sustituyente apropiado o a la cadena lateral del anticuerpo o fragmento del anticuerpo o a una cadena de azúcar en el anticuerpo o fragmento del anticuerpo (*Antibody Engineering Handbook*, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)).

5 Además, se pueden producir genéticamente por la unión de un ADN que codifica el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo de la presente invención que reacciona específicamente con CCR4 a otro ADN que codifica una proteína a la que se va a unir, insertando el ADN en un vector de expresión, e introduciendo el vector de expresión en una célula huésped.

10 El radioisótopo puede ser ^{131}I , ^{125}I , y similares, y se puede conjugar con el anticuerpo mediante, por ejemplo, un método con cloramina T.

El agente es preferiblemente un compuesto de bajo peso molecular. Ejemplos son los fármacos anticancerosos como fármacos alquilantes (como, por ejemplo, mostaza nitrogenada o ciclofosfamida), antagonistas metabólicos (como, por ejemplo, 5-fluorouracilo o metotrexato), antibióticos (como, por ejemplo, daunomicina, bleomicina, mitomicina C, daunorubicina o doxorubicina), alcaloides vegetales (como, por ejemplo, vincristina, vinblastina o vindesina), sustancias hormonales (como, por ejemplo, tamoxifeno o dexametasona), y similares (*Clinical Oncology*, editado por Japanese Society of Clinical Oncology, publicado por Cancer and Chemotherapy (1996)); fármacos antiinflamatorios como esteroides (como, por ejemplo, hidrocortisona o prednisona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (como, por ejemplo, aspirina o indometacina), inmunomoduladores (como, por ejemplo, aurotiomalato o penicilamina), fármacos inmunosupresores (como, por ejemplo, ciclofosfamida o azatioprina) y fármacos antihistamínicos (como, por ejemplo, maleato de clorfeniramina o clemastina) (*Inflammation and Antiinflammatory Therapy*, Ishiyaku Shuppan (1982)); y similares. El método para conjugar daunomicina a un anticuerpo puede ser un método en el que se conjugan daunomicina y un grupo amino de un anticuerpo a través de glutaraldehído, un método en el que se conjugan un grupo amino de daunomicina y un grupo carboxilo de un

anticuerpo mediante una carbodilimida hidrosoluble, y similares.

La proteína es preferiblemente una citocina que activa las células inmunes. Ejemplos pueden ser la interleucina 2 humana (denominada en lo sucesivo "hIL-2"), el factor estimulante de la colonia de macrófagos granulocitos humanos (denominado en lo sucesivo "hGMCSF"), el factor estimulante de la colonia de macrófagos humanos (denominado en lo sucesivo "hMCSF"), la interleucina 12 humana (denominada en lo sucesivo "hIL-12"), y similares. Además, para inhibir directamente las células cancerosas se puede usar una toxina como ricina, la toxina diftérica, y similares. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo de fusión con una proteína uniendo el ADNc que codifica un anticuerpo o fragmento del anticuerpo con otro ADNc que codifique la proteína, construyendo el ADN que codifica el anticuerpo de fusión, insertando el ADN en un vector de expresión de células procariotas o un vector de expresión de células eucariotas, e introduciéndolo después en células procariotas o células eucariotas para expresar el anticuerpo de fusión.

A continuación se explican los métodos para la producción del anticuerpo humano injertado en una CDR, y el fragmento de dicho anticuerpo, que reaccionan específicamente con CCR4, los métodos para la evaluación de la actividad de los mismos y los métodos para su uso.

1. Preparación del anticuerpo humano injertado en una CDR

(1) Construcción del vector de expresión del anticuerpo humanizado

Un vector de expresión del anticuerpo humanizado es un vector de expresión para una célula animal en cuyos genes se han insertado los que codifican la CH y la CL de un anticuerpo humano, y se construye por clonación de cada CH y CL de un anticuerpo humano en un vector de expresión para una célula animal.

La región C de un anticuerpo humano puede ser una CH y CL de cualquier anticuerpo humano. Ejemplos pueden ser las CH de subclase γ y CL de subclase κ de un anticuerpo humano, y similares. Además, se puede

usar el ADNc. Como vector de expresión para una célula animal se puede usar cualquier vector de expresión, siempre que se pueda insertar y expresar una región C de un anticuerpo humano. Ejemplos son pAGE107 (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), pAGE103 (*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)),
5 pHSG274 (*Gene*, 27, 223 (1984)), pKCR (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1527 (1981)), pSGI β d2-4 (*Cytotechnology*, 4, 173 (1990)), pSE1UK1Sed1-3 (*Cytotechnol.*, 13, 79 (1993)), y similares. El promotor y potenciador usado para un vector de expresión para una célula animal puede ser un promotor y potenciador SV40 precoz (*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)), un promotor y
10 potenciador LTR del virus de la leucemia de ratón Moloney (*Biochem. Biophys. Res. Comun.*, 149, 980 (1987)), un promotor (*Cell*, 41, 479 (1985)) y un potenciador (*Cell*, 33, 717 (1983)) de la cadena H de una inmunoglobulina, y similares.

El vector de expresión del anticuerpo humanizado puede ser de un
15 tipo en el que existe un gen que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen que codifica una cadena L de un anticuerpo en vectores diferentes o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión del anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células animales y el
20 equilibrio entre las cantidades expresadas de las cadenas H y L del anticuerpo en células animales, es más preferible usar un tipo tándem del vector de expresión del anticuerpo humanizado (*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994)). El tipo tándem del vector de expresión del anticuerpo humanizado incluye pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 (HYBRIDOMA, 17,
25 559 (1998)), y similares.

El vector de expresión del anticuerpo humanizado construido se puede usar para la expresión de un anticuerpo humano injertado en una CDR en células animales.

30 (2) Construcción del ADNc que codifica la región V de anticuerpo humano injertado en una CDR

Los ADNc que codifican una VH y una VL de un anticuerpo humano injertado en una CDR se pueden obtener de la siguiente manera. En primer lugar, se seleccionan las secuencias de aminoácidos de FR en una VH y una VL de un anticuerpo humano en que se van a insertar las secuencias de aminoácidos de CDR en una VH y una VL de un anticuerpo derivado de un anticuerpo de un animal no humano. Se pueden usar cualquiera de las secuencias de aminoácidos de FR en una VH y una VL de un anticuerpo humano, siempre que deriven del hombre. Ejemplos incluyen las secuencias de aminoácidos de FR en una VH y una VL de anticuerpos humanos registrados en bases de datos como Protein Data Bank, etc., y las secuencias de aminoácidos comunes a los subgrupos de FR en una VH y una VL de anticuerpos humanos. (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services (1991)), etc. Para producir un anticuerpo humano injertado en una CDR que tiene una actividad potente, se seleccionan preferiblemente las secuencias de aminoácidos que tienen una homología alta (al menos el 60% o mayor) con la secuencia de aminoácidos de FR en una VH y una VL de un anticuerpo diana derivado de un animal no humano.

A continuación, se injertan las secuencias de CDR en una VH y una VL del anticuerpo derivado de un animal no humano en las secuencias de aminoácidos de FR en una VH y una VL de un anticuerpo humano seleccionadas para diseñar las secuencias de aminoácidos de una VH y una VL de un anticuerpo humano injertado en una CDR. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en secuencias de ADN teniendo en cuenta la frecuencia del uso de codones encontrado en las secuencias de nucleótidos de los genes de los anticuerpos (*Sequence of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services (1991)), y se diseñan las secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos de una VH y una VL de un anticuerpo humano injertado en una CDR. Se sintetizan varios ADN sintéticos que tienen una longitud de aproximadamente 100 a 200 nucleótidos, y se realiza la PCR con ellos. En

este caso, se prefiere que en cada VH y VL se diseñen 4 ó 6 ADN sintéticos en vista de la eficiencia de la reacción de la PCR y de las longitudes de los ADN que se puedan sintetizar. Además, se pueden clonar fácilmente en el vector de expresión del anticuerpo humanizado construido en el apartado 1(1) mediante la introducción de la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en el extremo 5' de los ADN sintéticos presentes en ambos extremos. Después de la PCR se clona un producto amplificado de un plásmido como pBluescript SK (-) (fabricado por Stratagene) o similar y se determinan las secuencias del nucleótido para obtener un plásmido que tiene las secuencias de ADN que codifican una VH y una VL del anticuerpo humano injertado en una CDR que se ha diseñado.

(3) Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo humano injertado en una CDR

Se sabe que cuando un anticuerpo humano injertado en una CDR se produce injertando simplemente sólo la CDR en una VH y una VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en la FR en una VH y una VL de un anticuerpo humano, su actividad de unión al antígeno es menor que la del anticuerpo original derivado de un animal no humano (*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991)). Como causa, se considera que hay varios residuos de aminoácidos no sólo en la CDR sino también en la FR que están directa o indirectamente relacionados con la actividad de unión al antígeno en una VH y una VL del anticuerpo original derivado de un animal no humano, y que se cambian a un residuo de aminoácidos diferente de una FR diferente en una VH y una VL de un anticuerpo humano. Para solucionar el problema, en los anticuerpos humanos injertados en una CDR, entre las secuencias de aminoácidos de la FR en una VH y una VL de un anticuerpo humano se identifica un residuo de aminoácido que se refiere directamente a la unión a un antígeno, o un residuo de aminoácido que se refiere indirectamente a la unión a un antígeno por interacción con un residuo de aminoácido en una CDR o manteniendo la estructura tridimensional de un

anticuerpo y se modifica para obtener un residuo de aminoácido que se encuentra en el anticuerpo original de un animal no humano para, de esta manera, aumentar la actividad de unión al antígeno que se ha disminuido (*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991)). En la producción de un anticuerpo humano injertado en una CDR lo más importante es determinar el grado de eficiencia de la identificación del residuo de aminoácidos relacionados con la actividad de unión al antígeno en la FR, de forma que se construye y analiza la estructura tridimensional de un anticuerpo mediante cristalografía por rayos X (*J. Mol. Biol.*, 112, 535 (1977)), modelado por ordenador (*Protein Engineering*, 7, 1501 (1994)), etc. Aunque la información de la estructura tridimensional de los anticuerpos ha sido útil para la producción de un anticuerpo humano injertado en una CDR, aún no se ha establecido ningún método para la producción de un anticuerpo humano injertado en una CDR que se pueda aplicar a cualquier anticuerpo. Por lo tanto, actualmente es necesario realizar varios intentos, por ejemplo, se producen varios anticuerpos modificados de cada anticuerpo y se analiza la relación entre cada uno de los anticuerpos modificados y la actividad de unión de su anticuerpo.

La modificación de la secuencia de aminoácidos seleccionada de la FR en una VH y una VL de un anticuerpo humano puede realizarse usando varios ADN sintéticos para su modificación de acuerdo con la PCR. Con respecto al producto amplificado obtenido por PCR, la secuencia de nucleótido se determina según el método que se describe en el apartado 1(2) de forma que se confirma si se ha conseguido la modificación objetiva.

25

(4) Construcción del vector de expresión de un anticuerpo humano injertado en una CDR

Se puede construir un vector de expresión de un anticuerpo humano injertado en una CDR clonando el ADNc que codifica una VH y una VL del anticuerpo humano injertado en una CDR construido en los apartados 1(2) y 1(3) en los genes antisentido que codifican una VH y una VL del anticuerpo

30

humano en el vector de expresión del anticuerpo humanizado según se describe en el apartado 1(1). Por ejemplo, cuando se introducen los loci de reconocimiento para las enzimas de restricción apropiadas en el extremo 5'-terminal de los ADN sintéticos situados a ambos extremos entre los ADN sintéticos usados en la construcción de una VH y una VL del anticuerpo humano injertado en una CDR en los apartados 1(2) y 1(3), se puede realizar la clonación de forma que se expresen en una forma apropiada en los genes antisentido que codifican la CH y la CL del anticuerpo humano en el vector de expresión del anticuerpo humanizado según se describe en el elemento 1(1).

10

(5) Expresión transitoria del anticuerpo humano injertado en una CDR

Para evaluar eficientemente la actividad de unión al antígeno de varios anticuerpos humanos injertados en una CDR producidos, se pueden expresar los anticuerpos humanos injertados en una CDR de forma transitoria usando el vector de expresión de anticuerpo humano injertado en una CDR como se describe en el apartado 1(4) o el vector de expresión modificado de los mismos. Se puede usar cualquier célula como una célula huésped, siempre que la célula huésped pueda expresar un anticuerpo humano injertado en una CDR. En general, se usa la célula COS-7 (ATCC CRL1651) en vista de su cantidad de expresión alta (*Methods in Nucleic Acids Res.*, CRC Press, p. 283 (1991)). El método para la introducción del vector de expresión en la célula COS-7 consiste en un método con DEAE-dextrano (*Methods in Nucleic Acids Res.*, CRC Press, p. 283 (1991)), un método de lipofección (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987)), etc.

Después de la introducción del vector de expresión, se puede determinar la cantidad de expresión y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo humano injertado en una CDR en el sobrenadante del cultivo mediante inmunoensayo enzimático (ELISA); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Capítulo 14 (1988), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited (1986)), etc.

30

(6) Expresión estable del anticuerpo humano injertado en una CDR

Se puede obtener un transformante que produce un anticuerpo humano injertado en una CDR de forma estable por la introducción en una célula huésped apropiada del vector de expresión del anticuerpo humano
 5 injertado en una CDR que se describe en el apartado 1(4).

El método para la introducción del vector de expresión en una célula huésped incluye la electroporación (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), etc.

Cualquier célula se puede usar como la célula huésped en la se va a introducir el vector de expresión de anticuerpo humano injertado en una
 10 CDR, siempre que pueda expresar un anticuerpo humano injertado en una CDR. Ejemplos son células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), células CHO defectuosas en el gen de la dihidrofolato reductasa (defr) (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 4216 (1980)), células de rata YB2/3HL.P2.G11 16Ag.20 (célula YB2/0; ATCC
 15 CRL1662), etc.

Después de la introducción del vector de expresión, se seleccionan los transformantes que expresan un anticuerpo humano injertado en una CDR de forma estable mediante el cultivo en un medio de cultivo de una célula animal que contiene un fármaco como sulfato G418 (G418; fabricado por
 20 Sigma) o similar (*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994)). El medio de cultivo para una célula animal puede ser el medio PRMI1640 (fabricado por Nissui Pharmaceutical), el medio GIT (fabricado por Nissui Pharmaceutical), el medio EX-CELL302 (fabricado por JRH), el medio IMDM (fabricado por GIBCO BRL), el medio Hybridoma-SFM (fabricado por GIBCO BRL), el
 25 medio obtenido por la adición de varios aditivos como FBS a estos medios, y similares. El anticuerpo humano injertado en una CDR puede producirse y acumularse en un medio de cultivo tras el cultivo de los transformantes seleccionados en un medio. La cantidad de expresión y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo humanizado en el sobrenadante del cultivo se
 30 pueden medir por ELISA o similar. Además, en el transformante se puede aumentar la cantidad de expresión del anticuerpo humano injertado en una

CDR utilizando un sistema de amplificación del dhfr o similar (*J. Immunol. Methods*, **167**, 271 (1994)).

El anticuerpo humano injertado en una CDR se puede purificar en el sobrenadante del cultivo del transformante usando una columna de proteína A (*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Capítulo 8 (1988), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited (1996)). Se puede usar cualquier otro método convencional para la purificación de proteínas. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado se puede purificar mediante una combinación de filtración en gel, cromatografía por intercambio iónico, ultrafiltración, y similares. El peso molecular de la cadena H o de la cadena L del anticuerpo humanizado purificado o de la molécula del anticuerpo en su conjunto se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; *Nature*, **227**, 680 (1970)), transferencia Western (*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Capítulo 12 (1988), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited (1996)), etc.

2. Preparación del fragmento del anticuerpo

El fragmento del anticuerpo se puede preparar a partir del anticuerpo humanizado que se describe en el apartado 1 usando la ingeniería genética o la ingeniería de proteínas. El fragmento del anticuerpo puede ser Fab, F(ab')₂, Fab', sdFv, diabody, dsFv, un péptido que contiene CDR, y similares.

(1) Preparación del Fab

El Fab se puede preparar tratando la IgG con la enzima proteolítica papaína. Después del tratamiento con esta enzima, cuando el anticuerpo original es una subclase de IgG que tiene una actividad de unión a la proteína A, se puede recuperar un Fab uniforme al separarlo de las moléculas de IgG y de los fragmentos Fc al hacerlo pasar por una columna de proteína A (*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, tercera edición (1995)). Cuando el anticuerpo original es un anticuerpo de subclase

IgG que no tiene actividad de unión a la proteína A, el Fab se puede recuperar por cromatografía de intercambio iónico en la fracción eluida con una concentración baja de sal (*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, tercera edición (1995)). Además, el Fab también se puede preparar por técnicas de ingeniería genética usando *Escherichia coli*. Por ejemplo, se puede preparar un vector de expresión Fab can clonando el ADN que codifica la región V del anticuerpo que se describe en los apartados 1(2) y 1(3) en un vector para la expresión Fab. Como vector para la expresión Fab se puede usar cualquier vector, siempre que se pueda insertar y expresar un ADN para el Fab. Ejemplos son pIT106 (*Science*, 240, 1041 (1988)), etc. El Fab se puede formar y acumular en un cuerpo de inclusión o en un espacio periplásmico mediante la introducción del vector de expresión Fab en una *Escherichia coli* apropiada. El Fab activo se puede obtener a partir del cuerpo de inclusión por un método de replegamiento que se usa habitualmente para proteínas y cuando se expresa en el espacio periplásmico el Fab activo se pierde hacia el sobrenadante del cultivo. El Fab uniforme se puede purificar después del replegamiento o del sobrenadante del cultivo usando una columna unida al anticuerpo (*Antibody Engineering, A Practical Guide*, W.H. Freeman and Company (1992)).

20

(2) Preparación del F(ab')₂

El F(ab')₂ se puede preparar tratando la IgG con una enzima proteolítica papaína. Después del tratamiento con papaína se puede recuperar como un F(ab')₂ uniforme mediante un procedimiento de purificación similar al caso de Fab (*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, tercera edición, Academic Press (1995)). Además, también se puede preparar por el método que se describe en el apartado 2(3) en el que el Fab' se trata con maleimida como o-PDM, hexano bismaleimida o similar para formar un enlace tioéter, o un método en el que se trata con DTNB para formar un enlace S-S (*Antibody Engineering, A Practical Approach*, IRL PRESS (1996)).

30

(3) Preparación del Fab'

El Fab' se puede preparar por técnicas de ingeniería genética usando *Escherichia coli*. Por ejemplo, se puede construir un vector de expresión Fab' clonando el ADN que codifica la región V del anticuerpo que se describe en los apartados 1(2) y 1(3) en un vector para la expresión Fab'. Como vector para la expresión Fab' se puede usar cualquier vector, siempre que se pueda insertar y expresar un ADN para el Fab'. Ejemplos son pAK19 (*Bio/Technology*, 10, 163 (1992)), etc. El Fab' se puede formar y acumular en un cuerpo de inclusión o espacio periplásmico mediante la introducción del vector de expresión Fab' en una *Escherichia coli* apropiada. El Fab' activo se puede obtener a partir del cuerpo de inclusión por un método de replegamiento que se usa en general para proteínas y cuando se expresa en el espacio periplásmico se puede recuperar en el componente extracelular tras la lisis celular mediante el tratamiento con una digestión parcial con lisozima, un golpe de presión osmótica, sonicación o similar. El Fab' uniforme se puede purificar después del replegamiento o a partir de la suspensión de células lisadas usando una columna con proteína G o similar (*Antibody Engineering, A Practical Approach*, IRL PRESS (1996)).

20

(4) Preparación del scFv

El scFv se puede preparar usando un fago o una *Escherichia coli* mediante técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, se produce un ADN que codifica el scFv ligando los ADN que codifican la VH y la VL del anticuerpo como se describe en los apartados 1(2) y 1(3) mediante un ADN que codifica un polipéptido ligante que contiene una secuencia de aminoácidos de 12 residuos o más. Se puede construir un vector de expresión scFv clonando el ADN resultante en un vector para la expresión scFv. Como vector para la expresión scFv se puede usar cualquier vector, siempre que se pueda insertar y expresar un ADN para scFv. Ejemplos son pCANTAB5E (fabricado por Pharmacia), Phfa (*Hum. Antibody Hybridoma*, 5,

30

48 (1994)), etc. El vector de expresión del scFv se introdujo en una *Escherichia coli* apropiada y se infectó con un fago colaborador para, de esta manera, obtener un fago que expresa el scFv en la superficie del fago en una forma fusionada en la proteína de superficie del fago. Además, el scFv se puede formar y acumular en el cuerpo de inclusión o en el espacio periplásmico de *Escherichia coli* en que se introduce el vector de expresión del scFv. El scFv activo se puede obtener a partir del cuerpo de inclusión mediante un método de replegamiento que se usa habitualmente para proteínas y cuando se expresa en el espacio periplásmico se puede recuperar en el medio extracelular mediante la lisis de las células con un tratamiento como digestión parcial de lisozimas, un golpe de presión osmótica, sonicación o similar. El scFv uniforme se puede purificar después del replegamiento o a partir de la suspensión de células lisadas mediante cromatografía de intercambio catiónico o similar (*Antibody Engineering, A Practical Approach*, IRL PRESS (1996)).

(5) Preparación del diabody

El diabody se puede preparar cambiando el tamaño del polipéptido ligante para preparar el scFv hasta aproximadamente 3 a 10 residuos. Se puede preparar un diabody divalente cuando se usa una VH y una VL de una especie de anticuerpo, y un diabody que tiene dos especificidades diferentes cuando se usan una VH y una VL de dos especies de anticuerpo (*FEBS Letters*, 453, 164 (1999), *Int. J Cancer*, 77, 763 (1998)).

(6) Preparación del dsFv

El dsFv se puede preparar usando *Escherichia coli* mediante técnicas de ingeniería genética. En primer lugar, se produce el ADN en el que el residuo de aminoácidos codificado se ha remplazado con un residuo cisteína mediante la introducción de una mutación en posiciones apropiadas del ADN que codifica la VH y la VL del anticuerpo descritas en los apartados 1(2) y 1(3). Los vectores de expresión de la VH y de la VL se pueden producir por

clonación de cada ADN resultante en un vector para la expresión del dsFv. Como vector para la expresión del dsFv se puede usar cualquier vector, siempre que se pueda insertar y expresar un ADN para dsFv. Ejemplos son pULI9 (*Protein Engineering*, 7, 697 (1994)), etc. Los vectores de expresión de la VH y de la VL se introducen en una *Escherichia coli* apropiada en la cual se forman y acumulan la VH y la VL en el cuerpo de inclusión o espacio periplásmico. La VH y la VL se obtienen a partir de dicho cuerpo de inclusión o espacio periplásmico y se mezclan, y el dsFv activo se puede obtener por un método de replegamiento utilizado habitualmente para proteínas. Después del replegamiento se puede purificar aún más por cromatografía de intercambio de iones y filtración en gel o similar (*Protein Engineering*, 7, 697 (1994)).

(7) Preparación del péptido que contiene la CDR

Se puede preparar un péptido que contiene la CDR mediante un método de síntesis química como Fmoc, tBoc, y similares. Además, se prepara un ADN que codifica un péptido que comprende la CDR y el ADN resultante se clona en un vector apropiado para la expresión, mediante el cual se prepara el péptido que contiene la CDR. Como vector para la expresión se puede usar cualquier vector, siempre que se inserte y exprese un ADN que codifique un péptido que comprende la CDR. Ejemplos son pLEX (fabricado por Invitrogen), pAX4a+ (fabricado por Invitrogen), y similares. El vector de expresión se introduce en una *Escherichia coli* apropiada de forma que el péptido que contiene la CDR se puede formar y acumular en el cuerpo de inclusión o espacio periplásmico. El péptido que contiene la CDR se puede obtener a partir del cuerpo de inclusión o espacio periplásmico y se puede purificar mediante cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel o similar (*Protein Engineering*, 7, 697 (1994)).

3. Evaluación de la actividad y propiedades del anticuerpo de la presente invención

(1) Evaluación de la actividad de unión para el antígeno

La actividad de unión del anticuerpo de la presente invención para un antígeno se puede medir mediante una valoración inmunoabsorbente ligada a enzimas (ELISA), una técnica con anticuerpos fluorescentes (*Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373 (1993), resonancia de superficie plasmática usando un equipo BIAcore™, y similares. Específicamente, se produce un péptido sintético que contiene una secuencia parcial de la CCR4 y se prepara un conjugado mediante su unión química a una proteína transportadora como albúmina sérica bovina o similar. La actividad de unión CCR4 del anticuerpo de la presente invención se puede medir mediante la inmovilización del conjugado en una placa de ELISA, permitiéndolo reaccionar con el anticuerpo de la presente invención, y permitiendo también que reaccione con un anticuerpo marcado o un fragmento de unión como un anticuerpo o un fragmento de unión marcado con peroxidasa o biotina, y midiendo a continuación un colorante mediante un fotómetro de absorción.

(2) Reactividad para células que expresan CCR4

Para examinar la reactividad para células que expresan CCR4, es preferible usar un método para detectar eficientemente la CCR4 expresada en la superficie celular. El método incluye la citometría de flujo usando la técnica de los anticuerpos fluorescentes, y similares. Además, cuando se examina la reactividad con células corporales vivas como las plaquetas, y similares, es preferible realizar el análisis en condiciones tan cercanas a las del cuerpo vivo como sea posible. Por estas razones, cuando se examina la reactividad del anticuerpo anti-CCR4 de la presente invención es más deseable realizar el análisis mediante citometría de flujo usando la técnica de los anticuerpos fluorescentes.

El anticuerpo usado en la técnica de los anticuerpos fluorescentes puede ser o un anticuerpo marcado con un material fluorescente como FITC, biotina o similar, o un anticuerpo no marcado. Dependiendo de la presencia o

ausencia de un marcador en el anticuerpo usado y su entorno, se emplea avidina marcada con fluorescencia, un anticuerpo antiinmunoglobulina humana marcado con fluorescencia, o similares. La reactividad se puede evaluar mediante la reacción de adición de una cantidad suficiente de un anticuerpo anti-CCR4 (en general, entre 0,1 y 10 µg/ml como concentración final) a una muestra estudiada y comparando su reactividad con la encontrada en un anticuerpo de control negativo y un anticuerpo de control positivo.

10 (3) Actividad citotóxica

La actividad citotóxica para células que expresan CCR4 se puede evaluar midiendo la actividad CDC, la actividad ADCC, o similares. (*Cancer Immunol. Immunother.*, 38, 373 (1993)). Los cambios en la cantidad de citocina producida se pueden medir mediante un método ELISA, la técnica de los anticuerpos fluorescentes, o similares, usando un anticuerpo para la citocina.

(4) Actividad de inhibición de la unión al ligando

La actividad de inhibición de la unión al ligando del anticuerpo anti-CCR4 de la presente invención se puede examinar usando un TARC o un MDC marcado como el ligando que tiene la actividad de unión a CCR4 y una célula que expresa CCR4 o una fracción de la membrana celular. TARC o MDC se pueden marcar por cualquier técnica que se pueda detectar, y como ejemplo se incluye el marcado con fluorescencia, el marcado con enzimas, el marcado con radiación, o similares. Ejemplos específicos son el método de medición de la actividad de inhibición de la unión usando un marcador radiactivo tal como se describe en WO 00/42074.

Además, se puede examinar la actividad de inhibición de la unión al ligando del anticuerpo anti-CCR4 de la presente invención usando una respuesta celular inducida por la unión del ligando a la CCR4 como índice. La respuesta celular puede ser de cualquier tipo, siempre que se induzca por

contacto entre un ligando con una célula que expresa la CCR4, y ejemplos son los cambios en la concentración de calcio intracelular, la migración celular, y similares. Ejemplos específicos son el método de medición de la inhibición de la migración de una célula que expresa CCR4 inducida por un
5 ligando CCR4 descrito en WO 00/42074.

(5) Análisis de la secuencia de reconocimiento

Se puede determinar una secuencia de aminoácidos reconocible por el anticuerpo de la presente invención usando un péptido sintético diseñado a
10 partir de la secuencia primaria de su correspondiente proteína antigénica.

La secuencia primaria del péptido sintético se diseña a partir de la secuencia primaria de la proteína antigénica. Para preparar una proteína en la que el péptido sintético se reticula con una proteína transportadora, se puede añadir un residuo cisteína al terminal carboxilo o al terminal amino del
15 péptido sintético. La proteína resultante se puede usar en el método ELISA que se describirá más adelante. Además, si es necesario, los extremos N-terminal y C-terminal del péptido sintético se pueden acetilar y amidar, respectivamente.

Se puede sintetizar un péptido mediante un método general de
20 síntesis peptídica en fase líquida o en fase sólida, o por cualquier método combinado de los mismos o un método modificado de los mismos (*International Journal of Peptide Protein Research*, 35, 161-214 (1990), "SolidPhase Peptide Synthesis", *Methods in Enzymology*, vol. 289, editado por Gregg B. Fields, Academic Press (1997), "Peptide Synthesis Protocols",
25 *Methods in Molecular Biology*, vol. 35, editado por Michael W. Pennington y Ben M. Dunn, Humana Press (1994)).

Además, también se puede usar un sintetizador peptídico automático. La síntesis de un péptido mediante un sintetizador peptídico se puede realizar utilizando un sintetizador peptídico comercializado, como el
30 sintetizador peptídico fabricado por Shimadzu Corp., el sintetizador peptídico fabricado por Advanced ChemTech Inc, USA (denominado en lo sucesivo

"ACT") o similar, usando aminoácidos N^α-Fmoc, aminoácidos N^α-Boc o similar, cuyas cadenas laterales se protegen adecuadamente y de acuerdo con sus programas de síntesis respectivos. Los aminoácidos protegidos utilizados como el material y las resinas transportadoras se pueden adquirir
5 en ABI Inc., Shimadzu Corp., Kokusan Kagaku K.K., NovaBiochem, Watanabe Kagaku K.K., ACT, AnaSpec Inc., Peptide Research Institute, etc.

Como método para determinar una secuencia de aminoácidos reconocible por el anticuerpo de la presente invención usando el péptido sintético, se puede usar cualquier técnica, siempre que sea un método que
10 pueda detectar la unión del péptido sintético al anticuerpo. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos reconocible por el anticuerpo se puede determinar marcando el péptido sintético con un material fluorescente, un material radiactivo o similar y examinando la actividad de unión del péptido marcado resultante con el anticuerpo. Además, se puede realizar reticulando el
15 péptido sintético con una proteína como albúmina sérica bovina (BSA) o similar y evaluando la reactividad de la proteína resultante con el anticuerpo mediante ELISA o similar. Además, también se puede determinar la secuencia de aminoácidos reconocible por el anticuerpo de la presente invención utilizando una sustancia con la que ya se ha confirmado la unión
20 del anticuerpo, como una proteína anticuerpo, y examinando el péptido sintético que inhiba la unión del anticuerpo a la sustancia.

4. Método para la detección y cuantificación de la CCR4 usando un anticuerpo anti-CCR4

25 La presente invención se refiere a un método para la detección inmunológica y determinación de CCR4 o de una célula que expresa CCR4 en su superficie celular usando el anticuerpo de la presente invención.

Los métodos de detección inmunológica y determinación de CCR4 o de una célula que expresa CCR4 en su superficie celular usando el
30 anticuerpo de la presente invención son un método de inmunofluorescencia, un método de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA), un inmunoensayo

con material radiactivo marcado (RIA), un método de tinción inmunohistoquímica, como un método de tinción inmunocelular, un método de tinción inmunotisular, o similar (método ABC, método CSA, o similares.), el inmunoensayo enzimático anterior, un ELISA en sándwich (*Monoclonal*
5 *Antibody Experiment Manual* (publicado por Kodansha Scientific, 1987), *Second Series Biochemical Experiment Course*, Vol. 5, *Immunobiochemistry Research Method*, publicado por Tokyo Kagaku Dojin (1986)).

El método de inmunofluorescencia consiste en la reacción de una célula, tejido o similar independiente con el anticuerpo de la presente
10 invención, la reacción del reactante con un anticuerpo antiinmunoglobulina o la unión del fragmento marcado con una sustancia fluorescente como isotiocianato de fluoresceína (FITC) o similar, y a continuación la medición de la sustancia fluorescente con un citómetro de flujo.

El método de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) comprende
15 la reacción de una célula o lisado celular, tejido o lisado tisular, sobrenadante del cultivo celular, suero, líquido pleural, líquido ascítico, líquido ocular o similar, independiente con el anticuerpo de la presente invención, haciendo reaccionar el reactante con un anticuerpo o fragmento de unión antiinmunoglobulina marcado con una enzima como peroxidasa, biotina o
20 similar y midiendo a continuación el colorante desarrollado resultante con un fotómetro de absorción.

El inmunoensayo con material radiactivo marcado (RIA) comprende la reacción de una célula o lisado celular, tejido o lisado tisular, sobrenadante del cultivo celular, suero, líquido pleural, líquido ascítico, líquido ocular o
25 similar, independiente con el anticuerpo de la presente invención, y la reacción posterior del reactante con un anticuerpo o fragmento de unión antiinmunoglobulina marcado con un radioisótopo, midiendo a continuación la radiactividad con un contador de centelleo o similar.

Los métodos de tinción inmunocelular e inmunotisular consisten en la
30 reacción de una célula, tejido o similar independiente con el anticuerpo de la presente invención, y la reacción del reactante con un anticuerpo o fragmento

de unión antiinmunoglobulina marcado con una sustancia fluorescente como isotiocianato de fluoresceína (FITC) o similar, o una enzima como peroxidasa, biotina o similar, observando a continuación la célula, tejido o similar con un microscopio.

5 El ELISA en sándwich es un método que consiste en la adsorción en una placa de uno o dos anticuerpos que tienen un epítopo diferente entre los anticuerpos de la presente invención; el marcado de otro anticuerpo con una sustancia fluorescente como FITC o similar o una enzima como peroxidasa, biotina o similar, la reacción de una célula o lisado celular, tejido o lisado
10 tisular, sobrenadante del cultivo celular, suero, líquido pleural, líquido ascítico, líquido ocular o similar, independiente con la placa que adsorbe el anticuerpo; y a continuación se le hace reaccionar con el anticuerpo marcado para realizar una reacción según la sustancia marcada.

15 5. Método para usar un anticuerpo humano injertado en una CDR o fragmento de dicho anticuerpo

Como el anticuerpo de la presente invención se une específicamente a una CCR4 que se expresa en una línea celular cultivada y muestra actividad citotóxica como la actividad CDC, la actividad ADCC, o similar, será útil para
20 el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con la CCR4 como las enfermedades mediadas por Th2, y similares. Además, como la proporción de las secuencias de aminoácidos derivadas de un anticuerpo humano es mayor que en los anticuerpos de un animal no humano, se espera que muestre una importante actividad citotóxica en el cuerpo humano,
25 no muestre inmunogenicidad y su efecto continúe durante largo tiempo.

Además, la producción de citocinas Th2 que son producidas por células como IL-4, IL-5, IL-13, y similares, se puede inhibir por la administración del anticuerpo de la presente invención a células o tejidos de un sujeto experimental.

30 Como ejemplo se usa la célula que expresa CCR4 en relación con la presente invención, célula Th2, o similar. La célula Th2 usada en la presente

invención es preferiblemente una célula Th2 activada o una célula Th2 memoria. Ejemplo son las células que tienen propiedades CD45RA- o CD45RO+ y CD4+.

5 Se generan las actividades citotóxicas del anticuerpo de la presente invención, como, por ejemplo, cuando el anticuerpo de la presente invención se une a las células que expresan la CCR4 como una célula Th2 para inducir de esta manera la apoptosis de la célula. Además, la célula se puede obstruir y deplecionar mediante la inducción de apoptosis.

10 Además, el método para diagnosticar enfermedades inmunes o cánceres mediados por Th2 incluye un método en el que se detecta por métodos inmunológicos una célula CCR4 positiva humana existente en células o tejidos de un sujeto experimental, como se ha descrito anteriormente.

15 Asimismo, el anticuerpo de la presente invención se puede usar como un producto para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con CCR4 como las enfermedades inmunes o cánceres mediados por Th2, o enfermedades en las que los estados mórbidos avanzan debido a un aumento o descenso anormal de las células Th2.

20 Además, como el anticuerpo de la presente invención puede reducir o deplecionar las células que expresan CCR4 mediante su actividad citotóxica, puede proporcionar un método para diagnóstico o un método terapéutico para enfermedades relacionadas con CCR4 como las enfermedades inmunes o cánceres mediados por Th2, que usan el anticuerpo de la presente invención, y fármacos terapéuticos y preventivos para
25 enfermedades relacionadas con CCR4 como enfermedades inmunes o cánceres mediados por Th2 que contienen el anticuerpo de la presente invención como un principio activo.

30 Las enfermedades inmunes mediadas por Th2 incluyen, independientemente de que sean leves o graves, enfermedades inflamatorias como hipersensibilidad de las vías respiratorias o asma bronquial agudas o crónicas, enfermedades atópicas cutáneas incluida la dermatitis atópica,

rinitis alérgica, polinosis, y similares; enfermedades causadas por células inflamatorias competentes como eosinófilos, mastocitos, y similares, que se pueden propagar o activar mediante citocinas y quimiocinas liberadas de células Th2, moléculas biológicamente funcionales como IgE, y similares que son producidas por citocinas y quimiocinas liberadas de células Th2, y similares; y enfermedades inmunes en las que el estado mórbido avanza debido a cambios anormales en las células Th2.

El anticuerpo de la presente invención se puede administrar sólo pero, en general, se prefiere proporcionarlo en forma de una formulación farmacéutica producida mezclándolo al menos con un vehículo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con un método bien conocido en el campo técnico de los productos farmacéuticos.

Se prefiere seleccionar una vía de administración que es la más eficaz para el transporte del tratamiento previsto como la administración oral o la administración parenteral como, por ejemplo, la administración intraoral, la administración traqueal, la administración rectal, la inyección subcutánea, la inyección intramuscular, la inyección intravenosa, y similares. La inyección intravenosa se prefiere para una formulación de un anticuerpo o un péptido.

La forma posológica puede consistir en aerosoles, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas, cintas, y similares.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral son emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, y similares.

Los preparados líquidos como emulsiones y jarabes pueden producirse usando aditivos como agua; sacáridos como, por ejemplo, sacarosa, sorbitol o fructosa; glicoles como, por ejemplo, polietilenglicol o propilenglicol; aceites como, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de oliva o aceite de soja; antisépticos como, por ejemplo, p-hidroxibenzoato; y saborizantes como, por ejemplo, sabor de fresa o menta.

Se pueden producir cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, y similares, usando aditivos como material de relleno, por ejemplo, lactosa,

glucosa, sacarosa o manitol; sustancias disgregantes como, por ejemplo, almidón o alginato sódico; lubricantes como, por ejemplo, estearato de magnesio; talco; ligantes como, por ejemplo, alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa o gelatina; surfactantes como, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos; y plastificantes como, por ejemplo, glicerina.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral son las inyecciones, supositorios, aerosoles, y similares.

Las inyecciones se pueden preparar usando un vehículo como una solución salina, una solución glucosada o una mezcla de ellas, y similares.

Los supositorios se pueden preparar usando un vehículo como manteca de cacao, grasa hidrogenada, ácido carboxílico, y similares.

Además, los aerosoles se pueden preparar a partir del propio anticuerpo o usando un vehículo o similar que no estimule las membranas orales y las mucosas de las vías respiratorias y que pueda facilitar la absorción del anticuerpo o fragmento de dicho anticuerpo al dispersarlo como partículas diminutas.

El vehículo puede ser lactosa, glicerina, y similares. Dependiendo de las propiedades del anticuerpo o del péptido y del vehículo que se va a utilizar se pueden producir aerosoles, polvos secos, y similares. Los aditivos que se han puesto como ejemplo en los preparados orales se pueden añadir a los preparados parenterales.

La dosis y frecuencia de administración varían dependiendo del efecto terapéutico previsto, el método de administración, el periodo de tratamiento, la edad, el peso corporal, y similares, pero, en general, la dosis varía entre 0,01 mg/kg a 20 mg/kg por día en el adulto.

La presente invención se describe a continuación mediante Ejemplos, pero la presente invención no se limita a ellos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra los pasos de construcción de un plásmido pKM216OGal0.

La Figura 2 muestra los pasos de construcción de un plásmido pKM216OGal1. El símbolo * muestra la posición del codón de mutación genética que modifica un residuo de aminoácidos.

La Figura 3 muestra los pasos de construcción de un plásmido pKM216OGal3. El símbolo * muestra la posición del codón de mutación genética que modifica un residuo de aminoácidos.

La Figura 4 muestra los pasos de construcción de un plásmido pKM2160LVO.

La Figura 5 muestra los pasos de construcción de un plásmido pKM2160LV1. El símbolo * muestra la posición del codón de mutación genética que modifica un residuo de aminoácidos.

La Figura 6 muestra los pasos de construcción de un plásmido pKANTEX2160LV0 y el plásmido pKANTEX2160Gal0LV0.

La Figura 7 muestra la reactividad de un sobrenadante del cultivo obtenido mediante la expresión transitoria de un vector de expresión de cada anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR en una célula COS-7, con un péptido CCR4 parcial según el método ELISA.

La Figura 8 muestra la reactividad de un sobrenadante del cultivo obtenido por la expresión transitoria de un vector de expresión de cada anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR preparado por el uso de otra FR en la célula COS-7, con un péptido CCR4 parcial según el método ELISA.

La Figura 9 muestra la reactividad de un anticuerpo anti-CCR4 purificado injertado en una CDR con un péptido CCR4 parcial.

La Figura 10 muestra la reactividad de un anticuerpo anti-CCR4 purificado injertado en una CDR con una célula de expresión alta de CCR4 (CCR4/EL-4).

La Figura 11 muestra la afinidad de un anticuerpo anti-CCR4 purificado injertado en una CDR con un péptido CCR4 parcial medido usando un sensor de resonancia magnética de la superficie plasmática.

La Figura 12 muestra la citotoxicidad según la actividad ADCC frente a células CCR4/EL-4.

ST
56

La Figura 13 muestra el efecto en la inhibición de la producción de IL-4, IL-13 e IFN- γ procedente de PBMC humanos.

La Figura 14 muestra la actividad de unión de cada anticuerpo a una plaqueta humana.

5 La Figura 15 muestra los pasos de construcción de los plásmidos pKM2160VH41 y pKM2160VL61.

La Figura 16 muestra el paso de construcción de un plásmido pKANTEX2160H.

10 La Figura 17 muestra el paso de construcción de un plásmido pKANTEX2160.

MEJOR FORMA DE REALIZAR LA INVENCION

Ejemplo 1

15 Producción del anticuerpo humano injertado en una CDR frente a CCR4:

1. Diseño del ADNc que codifica una VH y una VL del anticuerpo humano injertado en una CDR frente a CCR4.

20 (1) Diseño de la secuencia de aminoácidos de una VH del anticuerpo humano injertado en una CDR frente a CCR4

En primer lugar, se diseñó una secuencia de aminoácidos de la VH de un anticuerpo humano injertado en una CDR frente a CCR4 (anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR) como se indica a continuación. Se seleccionó una secuencia de aminoácidos de una FR de una VH de un anticuerpo humano para injertar las secuencias de aminoácidos de CDR1, 2 y 3 de una VH representada por los N° de ID de las SEC.: 1, 2 y 3 usando el anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4 (*Int. Immunol.*, 11, 81 (1999)) establecido en el Ejemplo de Referencia 1. Los anticuerpos humanos que tienen una homología alta con el anticuerpo KM2160 se recuperaron a partir de las bases de datos de secuencias de aminoácidos de proteínas existentes con el método BLASTP (*Nucleic Acid Res.*, 25, 3389 (1997)) usando GCG Package

25

30

(fabricado por Genetics Computer Group) como sistema analizador de la secuencia. Cuando la homología de la secuencia actual de los aminoácidos se comparó con las puntuaciones de homología, el número de acceso P01781 de la base de datos SWISSPROT, región Gal V-III de la cadena pesada de la Ig (Hoppe. Seylers. Z. Physiol Chem., 354, 1505-1509 (1973); denominada en lo sucesivo "Gal") era un anticuerpo humano que mostraba la homología más alta del 82,5%, de forma que se seleccionó la secuencia de aminoácidos de la FR del anticuerpo. Sin embargo, las posiciones en las que no se pueden determinar exclusivamente residuos de aminoácidos (posiciones 28 y 30 desde el N-terminal de un anticuerpo secretor) un residuo de aminoácidos que tiene una frecuencia de generación baja en secuencias de anticuerpos humanos (Thr como residuo final de la región V) se encontraron en la secuencia de aminoácidos de la FR de Gal en la base de datos. En consecuencia, se seleccionaron Ile y Ser como residuos encontrados en el anticuerpo KM2160 de ratón en las posiciones 28 y 30, y Thr como el residuo final de la región V se sustituyó por Ser. Como los residuos de aminoácidos se encuentran en frecuencias mayores en las secuencias de cualquier anticuerpo humano (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991), no se desvían de las secuencias de los anticuerpos humanos.

La secuencia de aminoácidos de la VH Gal0 del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR representada por el N° de ID de la SEC.: 4 se diseñó mediante el injerto de las secuencias de aminoácidos de CDR1, 2 y 3 de una VH del anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4 representado por los N° de ID de las SEC.: 1, 2 y 3, respectivamente, en las posiciones apropiadas de la secuencia de aminoácidos de la FR del anticuerpo humano determinado. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del N° de ID de la SEC.: 4 está representada por el N° de ID de la SEC.: 49.

Además, se diseñó una secuencia de aminoácidos de una VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR basada en las secuencias comunes clasificadas por Kabat *et al.*

Kabat *et al.* han clasificado la VH de varios anticuerpos humanos ya conocidos en tres subgrupos (HSG I a III) basados en la homología de sus secuencias de aminoácidos y han publicado secuencias comunes de cada subgrupo (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991). Es posible que la inmunogenicidad de las secuencias comunes esté reducida en el hombre. En consecuencia, para preparar un anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR que tiene una actividad alta, entre las secuencias de aminoácidos de la FR de las secuencias comunes de los tres subgrupos de la VH del anticuerpo humano, en el diseño se seleccionó una secuencia de aminoácidos de la FR que tiene la homología más alta con la secuencia de aminoácidos de la FR de una VH del anticuerpo KM2160. La Tabla 1 muestra el resultado de la recuperación de la homología entre las secuencias de aminoácidos de la FR de las secuencias comunes de la VH del anticuerpo humano de cada subgrupo y la secuencia de aminoácidos de la FR de una VH del anticuerpo KM2160. Como se muestra en la Tabla 1, la secuencia de aminoácidos de la FR de la región VH del anticuerpo KM2160 mostró la homología más alta con el subgrupo III.

20

Tabla I		
HSG I	HSG II	HSG III
57,47%	50,58%	77,01%

25

Según los resultados anteriores, se diseñó la secuencia de aminoácidos de la VH HV0 del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR representada por el N° de ID de la SEC.: 38 mediante el injerto de la secuencia de aminoácidos de la CDR de una VH del anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4 en una posición apropiada de la secuencia de aminoácidos de la FR de la secuencia común del subgrupo III de la VH del anticuerpo humano. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia

de aminoácidos de N° de ID de la SEC.: 38 está representada por el N° de ID de la SEC.: 57.

(2) Diseño de la secuencia de aminoácidos de una VL del anticuerpo humano injertado en una CDR frente a CCR4

A continuación, se diseñó una secuencia de aminoácidos de una VL de un anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR de la siguiente forma. Se seleccionó una secuencia de aminoácidos de la FR de una VL de un anticuerpo humano para injertar secuencias de aminoácidos de CDR1, 2 y 3 de una VL de un anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4 representada por los N° de ID de las SEC.: 5, 6 y 7, respectivamente. Kabat *et al.* han clasificado la VL de varios anticuerpos humanos ya conocidos en cuatro subgrupos (HSG I a IV) según la homología de sus secuencias de aminoácidos y han publicado secuencias comunes de cada grupo (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991). En consecuencia, entre las secuencias de aminoácidos de la FR de las secuencias comunes de los cuatro subgrupos de la VL del anticuerpo humano, se seleccionó una secuencia de aminoácidos de una FR que tiene la homología más alta con la secuencia de aminoácidos de una FR de una VL del anticuerpo KM2160. La Tabla 2 muestra un resultado de la recuperación de la homología entre las secuencias de aminoácidos de la FR de la secuencia común de cada subgrupo de la VL del anticuerpo humano y la secuencia de aminoácidos de una FR de una VL del anticuerpo KM2160. Como se muestra en la Tabla 2, la secuencia de aminoácidos de una FR de una VL del anticuerpo KM2160 mostró la homología más alta con el subgrupo II.

Tabla 2

HSG I	HSG II	HSG III	HSG IV
65,00%	82,50	65,00%	72,50%

Según los resultados anteriores, se diseñó la secuencia de aminoácidos LV0 de la VL del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR representada por el N° de ID de la SEC.: 8 injertando las secuencias de aminoácidos de CDR1, 2 y 3 de una VL del anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4 representada por los N° de ID de las SEC.: 5, 6 y 7, respectivamente, en las posiciones apropiadas en la secuencia de aminoácidos de la FR de la secuencia común del subgrupo II de la VL del anticuerpo humano. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del N° de ID de la SEC.: 8 está representada por el N° de ID de la SEC.: 53.

10

(3) Modificación de una VH y una VL del anticuerpo humano injertado en una CDR frente a CCR4

Las secuencias de aminoácidos Gal0 y HV0 de la VH, y la secuencia de aminoácidos LV0 de la VL del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR diseñado anteriormente son anticuerpos en los que se injerta la secuencia de aminoácidos de la CDR del anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4 sólo en las secuencias de aminoácidos de la FR del anticuerpo humano seleccionadas. Sin embargo, cuando se realiza sólo el injerto de la secuencia de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo de ratón, la actividad del anticuerpo humano injertado en una CDR disminuye con frecuencia, de forma que, para evitar el descenso, en general se injertan ciertos residuos de aminoácidos entre los residuos de aminoácidos de la FR diferentes entre un anticuerpo humano y un anticuerpo de ratón, que se considera que influyen en la actividad, junto a la secuencia de aminoácidos de la CDR. En consecuencia, en este ejemplo se desarrolló un análisis para identificar los residuos de aminoácidos de la FR que se considera que influyen en la actividad.

En primer lugar, se construyeron estructuras tridimensionales de las regiones V (Gal0LV0 y HV0LV0) del anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos Gal0 y HV0 de una VH y la secuencia de aminoácidos LV0 de una VL en el anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR diseñada

30

anteriormente, usando una técnica de modelado informático. Las coordenadas de la estructura tridimensional se prepararon usando un programa AbM (fabricado por Oxford Molecular), y las estructuras tridimensionales se mostraron usando un programa ProExplore (fabricado por Oxford Molecular) o RasMol (fabricado por Glaxo) según las instrucciones adjuntas del fabricante respectivo. Además, se construyeron del mismo modo los modelos informáticos de las estructuras tridimensionales de las regiones V del anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4. Además, del mismo modo se construyeron modelos de estructura tridimensional que contienen secuencias de aminoácidos modificadas, en las que ciertos residuos de las secuencias de aminoácidos de la FR de una VH y una VL de Gal0LV0 o HV0LV0, diferente del anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4, y se sustituyeron por otros residuos encontrados en posiciones correspondientes en el anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4, y se compararon las estructuras tridimensionales de las regiones V del anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4, la Gal0LV0 o la HV0LV0 y el producto modificado.

Como resultado, la estructura tridimensional de la región de unión al antígeno se cambió de forma que se seleccionaron Ala en la posición 40, Gly en la posición 42, Lys en la posición 43, Gly en la posición 44 y Lys en la posición 76 y Ala en la posición 97 en Gal0, Thr en la posición 28 y Ala en la posición 97 para HV0 e Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en LV0 como residuos considerados con influencia en la actividad del anticuerpo entre los residuos de aminoácidos de la FR de Gal0LV0 o HV0LV0. Entre estos residuos de aminoácidos seleccionados al menos un aminoácido se modifica en un residuo de aminoácidos o más encontrados en el anticuerpo de ratón KM2160 de forma que se diseñaron la VH y la VL del anticuerpo humano injertado en una CDR que tiene varias modificaciones.

En primer lugar, con respecto a la VH, por ejemplo, se diseñaron Gal1 representada por el N° de ID de la SEC.: 9 en la que se modificó Ala en la

posición 97 de Gal0, Gal2 representada por el N° de ID de la SEC.: 10 en la que se modificó Gly en la posición 42 y Gly en la posición 44 de Gal0, Gal3 representada por el N° de ID de la SEC.: 11 en la que se modificó Ala en la posición 97, Gly en la posición 42 y Gly en la posición 44 de Gal0, HV1 representada por el N° de ID de la SEC.: 39 en la que se modificó Thr en la posición 28 de HV0, HV2 representada por el N° de ID de la SEC.: 40 en la que se modificó Ala en la posición 97 de HV0, y HV3 representada por el N° de ID de la SEC.: 41 en la que se modificó Thr en la posición 28 y Ala en la posición 97 de HV0. Además, con respecto a la VL, por ejemplo, se diseñaron LV1 representada por el N° de ID de la SEC.: 12 en la que se modificó Ile en la posición 2, LV2 representada por el N° de ID de la SEC.: 13 en la que se modificó Val en la posición 3, y LV3 representada por el N° de ID de la SEC.: 14 en la que se modificó Ile en la posición 2 y Val en la posición 3. Las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 9 a 11, 39 a 41 y 12 a 14 están representadas por los N° de ID de las SEC.: 50 a 52, 58 a 60 y 54 a 56, respectivamente.

2. Construcción del ADNc que codifica el anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR

(I) Construcción del ADNc que codifica la VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR

El ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos Gal0 de una VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR diseñado en 1(1) del Ejemplo 1 se construyó usando PCR como se indica a continuación.

En primer lugar, se construyó la secuencia de aminoácidos completa del anticuerpo ligando la secuencia de aminoácidos diseñada con la secuencia de la señal secretora de la cadena H del anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4 representada por el N° de ID de la SEC.: 15. A continuación, la secuencia de aminoácidos se convirtió en codones genéticos. Cuando dos o más codones genéticos están presentes para un

residuo de aminoácidos, se determinó el codón genético correspondiente teniendo en cuenta el uso del codón encontrado en las secuencias de nucleótidos de los genes del anticuerpo (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991). Se diseñó una secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo completo ligando los codones genéticos determinados y se ligaron las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación por PCR (incluidas las secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción para clonaras en un vector para la expresión de un anticuerpo humanizado) en sus extremos 5'-terminal y 3'-terminal. La secuencia de nucleótidos diseñada se dividió en un total de 6 secuencias de nucleótidos, cada una con aproximadamente 100 nucleótidos contando desde el extremo 5'-terminal (las secuencias de nucleótidos contiguas se diseñaron de forma que tenían una secuencia complementaria de aproximadamente 20 nucleótidos en su terminal), y se sintetizaron 6 oligonucleótidos sintéticos de N° de ID de la SEC.: 16, 17, 18, 19, 20 y 21 en orden recíproco de una cadena sentido y una cadena antisentido (fabricada por GENSET).

La PCR se realizó añadiendo cada oligonucleótido a una solución de reacción que contiene dNTP 0,2 mM y cloruro de magnesio 1 mM para obtener una concentración final de 0,1 μ M, y ajustando el volumen total a 50 μ l usando el cebador RV M13 0,4 μ M (fabricado por Takara Shuzo), el cebador M3 M13 0,4 μ M (fabricado por GENSET) y 2,5 unidades de polimerasa KOD (fabricada por TOYOBO). La reacción se desarrolló con 30 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 74°C durante 60 segundos, y a continuación 1 ciclo a 74°C durante 10 minutos. La solución de reacción se purificó usando un kit de purificación QIA quick PCR (fabricado por QIAGEN) y finalmente se disolvió en agua estéril. La solución de reacción se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora usando 10 unidades de una enzima de restricción *Apal* (fabricada por Takara Shuzo) y 10 unidades de una enzima de restricción

NotI (fabricada por Takara Shuzo). La solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *Apal-NotI* de aproximadamente 0,47 kb.

5 A continuación, se dejaron reaccionar 3 µg del plásmido pBluescript II SK(-) (fabricado por Stratagene) con el fragmento usando 10 unidades de una enzima de restricción *Apal* (fabricada por Takara Shuzo) y 10 unidades de una enzima de restricción *NotI* (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. Dicha solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *Apal-NotI* de
10 aproximadamente 2,95 kb.

A continuación, el fragmento resultante *Apal-NotI* del producto de la PCR de una VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR y el fragmento *Apal-NotI* del plásmido pBluescript II SK(-) se ligaron usando un kit *Solution I of DNA Ligation* Ver. 2 (fabricado por Takara Shuzo) según las
15 instrucciones del fabricante. La *Escherichia coli* DH5α (fabricada por TOYOBO) se transformó usando la solución del plásmido de ADN recombinante obtenido de esta forma, cada plásmido de ADN se preparó a partir de los clones transformantes y las secuencias de nucleótidos se analizaron usando *Big Dye Terminator Kit* ver. 2 (fabricado por Applied
20 Biosystems). Como resultado del análisis de la secuencia de nucleótidos se obtuvo el plásmido pKM2160Gal0 que se muestra en la Figura 1, que tiene la secuencia de nucleótidos buscada. La *Escherichia coli* que se ha transformado con pKM2160Gal0, *Escherichia coli* DH5α/pKM2160Gal0, se ha depositado el 22 de agosto de 2001 como FERM BP-7709 en la
25 *International Patent Organism Depository*, del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón).

A continuación, los residuos de aminoácidos de la FR diseñada en 1(3) del Ejemplo 1 se modificó como se indica a continuación. Los codones
30 genéticos para los residuos de aminoácidos obtenidos después de la modificación se modificaron a su vez para obtener los codones genéticos

encontrados en el anticuerpo de ratón KM2160.

En el caso de la modificación de Ala en la posición 97 a Gly, la PCR se realizó usando 25 ng del plásmido pKM2160Gal0 preparado en este apartado como plantilla, calentando primero a 94°C durante 2 minutos y a continuación realizando 35 ciclos de la reacción, consistiendo cada ciclo en 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 40 segundos, en 50 µl de un sistema de reacción preparado mediante la adición de cada uno de los ADN sintéticos para la transferencia génica que contiene las secuencias de nucleótidos representadas por las ID de las SEC.:22 y 23 (fabricado por GENSET) como cebadores hasta obtener una concentración final de 0,4 µM y usando 2,5 unidades de polimerasa KOD plus (fabricada por TOYOBO) según las instrucciones del fabricante. La solución de reacción se purificó usando el kit de purificación *QIA quick PCR* (fabricado por QIAGEN) y finalmente se disolvió en agua estéril. El volumen total se dejó reaccionar durante 1 hora a 37°C usando 10 unidades de una enzima de restricción *Pst*I (fabricada por Takara Shuzo) y a continuación se dejó reaccionar durante 1 hora a 37°C usando 10 unidades de una enzima de restricción *Dra*III (fabricada por New England Biolabs). La solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *Pst*I-*Dra*III de aproximadamente 0,58 kb.

A continuación, se dejó reaccionar 3 µg del plásmido pKM2160Gal0 a 37°C durante 1 hora usando 10 unidades de una enzima de restricción *Pst*I (fabricada por Takara Shuzo) y a continuación se efectuó la reacción a 37°C durante 1 hora usando 10 unidades de una enzima de restricción *Dra*III (fabricada por New England Biolabs). La solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *Pst*I-*Dra*III de aproximadamente 2,7 kb.

A continuación, el fragmento *Pst*I-*Dra*III así obtenido derivado del producto de la PCR y el fragmento *Pst*I-*Dra*III derivado del plásmido pKM2160Gal0 se ligaron usando el kit *Solution 1 of DNA Ligation* Ver. 2 (fabricado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. La

Escherichia coli DH5 α (fabricada por TOYOBO) se transformó usando la solución del plásmido de ADN recombinante obtenido de esta forma, se preparó cada plásmido de ADN a partir de los clones transformantes y las secuencias de nucleótidos se analizaron usando el kit *Big Dye Terminator* ver. 2 (fabricado por Applied Biosystems). Como resultado del análisis de la secuencia de nucleótidos se obtuvo el plásmido pKM2160Gal1 que se muestra en la Figura 2, que tiene la secuencia de nucleótidos buscada. La *Escherichia coli* que se ha transformado con el plásmido pKM2160Gal1, *Escherichia coli* DH5 α /pKM2160Gal1, se ha depositado el 22 de agosto de 2001 como FERM BP-7710 en la *International Patent Organism Depositary* del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón).

Con las modificaciones de Gly en la posición 42 a Asp y Gly en la posición 44 en Arg, se obtuvo un plásmido pKM2160Gal2 realizando un método básicamente similar al anterior, excepto en que se usaron el ADN sintético para la transferencia del gen que contiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 24 (fabricado por GENSET) y el cebador RV M13 (fabricado por Takara Shuzo) como cebadores en la PCR. La *Escherichia coli* que se ha transformado con el plásmido pKM2160Gal2, *Escherichia coli* DH5 α /pKM2160Gal2, se ha depositado el 22 de agosto de 2001 como FERM BP-7711 en la *International Patent Organism Depositary* del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón).

Además, se construyó la modificación de los tres residuos anteriores como se indica a continuación. Aproximadamente 0,5 μ g de cada de residuo pKM2160Gal1 y pKM2160Gal2 obtenidos en la sección anterior se dejaron reaccionar a 37°C durante 1 hora usando 10 unidades de *NheI* (fabricado por Takara Shuzo) y a continuación se dejaron reaccionar a 37°C durante 1 hora usando *ScaI* (fabricado por Takara Shuzo). La solución de reacción se

fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperaron un fragmento *NheI*-*ScaI* de aproximadamente 1,3 kb derivado de pKM2160Gal1 y un fragmento de aproximadamente 2,0 kb derivado de pKM2160Gal2. Los dos fragmentos resultantes se ligaron usando el kit *Solution I of DNA Ligation* Ver. 2 (fabricado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. La *Escherichia coli* DH5 α (fabricado por TOYOBO) se transformó usando la solución del plásmido de ADN recombinante obtenido de esta forma, preparándose cada plásmido de ADN a partir de los clones transformantes y las secuencias de nucleótidos se analizaron usando el kit *Big Dye Terminator* ver. 2 (fabricado por Applied Biosystems). Como resultado del análisis de la secuencia de nucleótidos se obtuvo el plásmido pKM2160Gal3 que se muestra en la Figura 3, que tiene la secuencia de nucleótidos buscada. La *Escherichia coli* que se ha transformado con el plásmido pKM2160Gal3, *Escherichia coli* DH5 α /pKM2160Gal3, se ha depositado el 22 de agosto de 2001 como FERM BP-7712 en la *International Patent Organism Depositary* del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8565 Japón).

A continuación, se construyó un ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos HV0 de una VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado en la CDR diseñado en 1(1) del Ejemplo 1 usando la PCR como se indica a continuación.

En primer lugar, se construyó la secuencia de aminoácidos completa del anticuerpo ligando la secuencia de aminoácidos diseñada con la secuencia de la señal secretora de la cadena H del anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4 representada por el N° de ID de la SEC.: 15. A continuación, la secuencia de aminoácidos se convirtió en codones genéticos. Cuando dos o más codones genéticos están presentes para un residuo de aminoácidos, se determinó el codón genético correspondiente teniendo en cuenta el uso del codón encontrado en las secuencias de nucleótidos de los genes del anticuerpo (*Sequences of Proteins of*

Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services, 1991). Se diseñó una secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo completo ligando los codones genéticos determinados y se ligaron las secuencias de nucleótidos de los
5 cabadores para la amplificación por PCR (incluidas las secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción para clonaras en un vector para la expresión de un anticuerpo humanizado) en sus extremos 5'-terminal y 3'-terminal. La secuencia de nucleótidos diseñada se dividió en un total de 8 secuencias de nucleótidos, cada una con aproximadamente 100 nucleótidos
10 contando desde el extremo 5'-terminal (las secuencias de nucleótidos contiguas se diseñaron de forma que tenían una secuencia complementaria de aproximadamente 20 nucleótidos en su terminal), y se sintetizaron 6 oligonucleótidos sintéticos de N° de ID de las SEC.:16, 42, 43, 44, 45 y 21 en orden recíproco de una cadena sentido y una cadena antisentido (fabricado
15 por GENSET), y a continuación se obtuvo pKM2160HV0 por un método similar al de obtención de pKM2160Gal0 que se describe en este apartado. La *Escherichia coli* que se ha transformado con el plásmido pKM2160HV0, *Escherichia coli* DH5α/pKM2160HV0, se ha depositado el 27 de agosto de 2001 como FERM BP-7718 en la *International Patent Organism Depositary*
20 del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón).

En el caso de la modificación de Thr en la posición 28 a Ile, se obtuvo el plásmido pKM2160HV1, que tiene la secuencia de nucleótidos buscada,
25 con una reacción similar a la construcción de plásmido pKM2160HV0 anterior, usando un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 69 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 42, y usando un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos
30 representada por el N° de ID de la SEC.: 46 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.:

43. La *Escherichia coli* que se ha transformado con el plásmido pKM2160HV1, *Escherichia coli* DH5 α /pKM2160HV1, se ha depositado el 27 de agosto de 2001 como FERM BP-7719 en la *International Patent Organism Depositary* del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón)).

En la modificación de Thr en la posición 28 a Ile y Ala en la posición 97 a Gly, se obtuvo el plásmido pKM2160HV3, que tiene la secuencia de nucleótidos buscada, con una reacción similar a la construcción del plásmido pKM2160HV0 anterior, usando un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 69 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 42, usando un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 46 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 43 y usando un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 47 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 45. La *Escherichia coli* que se ha transformado con el plásmido pKM2160HV3, *Escherichia coli* DH5 α /pKM2160HV3, se ha depositado el 27 de agosto de 2001 como FERM BP-7721 en la *International Patent Organism Depositary* del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón)).

En la modificación de Ala en la posición 97 a Gly, el plásmido se construyó como se indica a continuación. Aproximadamente 0,5 μ g de cada plásmido pKM2160HV0 y pKM2160HV3 obtenido se dejaron reaccionar a 37°C durante 1 hora usando 10 unidades de una enzima de restricción *NheI* (fabricada por Takara Shuzo) y a continuación se dejaron reaccionar a 37°C durante 1 hora usando *ScaI* (fabricado por Takara Shuzo). La solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se

recuperaron un fragmento *NheI*-*ScaI* de aproximadamente 1,3 kb derivado de pKM2160HV3 y un fragmento de aproximadamente 2,0 kb derivado de pKM2160HVD. Los dos fragmentos resultantes se ligaron usando el kit *Solution I of DNA Ligation* Ver. 2 (fabricado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. La *Escherichia coli* DH5 α (fabricada por TOYOBO) se transformó usando la solución del plásmido de ADN recombinante obtenido de esta forma, preparándose cada plásmido de ADN a partir de los clones transformantes y las secuencias de nucleótidos se analizaron usando el kit *Big Dye Terminator* ver. 2 (fabricado por Applied Biosystems). Como resultado del análisis de la secuencia de nucleótidos, se obtuvo un plásmido pKM2160HV2, que tiene la secuencia de nucleótidos buscada. La *Escherichia coli* que se ha transformado con el plásmido pKM2160HV2, *Escherichia coli* DH5 α /pKM2160HV2, se ha depositado el 27 de agosto de 2001 como FERM BP-7720 en la *International Patent Organism Depositary*, del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón)).

(2) Construcción del ADNc que codifica la VL del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR

Se construyó un ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos LV0 de una VL del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR diseñada en 1(2) del Ejemplo 1 usando una PCR similar al caso de una VH como se indica a continuación. En este caso, se usó la secuencia de la cadena L del anticuerpo de ratón KM2160 anti-CCR4 que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 25 como secuencia de señal secretora.

En primer lugar, se sintetizaron 6 oligonucleótidos sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos que se describen en los N° de ID de la SEC.: 26, 27, 28, 29, 30 y 31 (fabricado por GENSET). La PCR se realizó añadiendo cada oligonucleótido a 50 μ l de una solución de reacción para obtener una concentración final de 0,1 μ M, y usando 0,4 μ M del cebador RV

24
21

M13 (fabricado por Takara Shuzo) y 0,4 μ M del cebador M4 M13 (fabricado por Takara Shuzo) o del cebador M3 M13 (fabricado por GENSET) representada por el N° de ID de la SEC.: 32 y 2,5 unidades de polimerasa KOD (fabricada por TOYOBO). La reacción se desarrolló mediante 30 ciclos, consltiendo cada ciclo en 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 74°C durante 60 segundos, y 1 ciclo posterior a 72°C durante 10 minutos. La solución de reacción se purificó usando el kit de purificación *QIA quick PCR* (fabricado por QIAGEN) y finalmente se disolvió en agua estéril. La solución de reacción se dejó reaccionar usando 10 unidades de una enzima de restricción *EcoRI* (fabricada por Takara Shuzo) y 10 unidades de una enzima de restricción *XhoI* (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un *EcoRI-XhoI* de aproximadamente 0,44 kb.

A continuación, se dejaron reaccionar 3 μ g del plásmido pBluescript II SK(-) (fabricado por Stratagene) usando 15 unidades de una enzima de restricción *EcoRI* (fabricada por Takara Shuzo) y 15 unidades de una enzima de restricción *XhoI* (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *EcoRI-XhoI* de aproximadamente 2,95 kb.

A continuación, el fragmento *EcoRI-XhoI* resultante del producto de la PCR de una VL del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR y el fragmento *EcoRI-XhoI* del plásmido pBluescript II SK(-) se ligaron usando el kit *Solution I of DNA Ligation* Ver. 2 (fabricado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. La *Escherichia coli* DH5 α (fabricada por TOYOBO) se transformó usando la solución del plásmido de ADN recombinante obtenido de esta forma, preparándose cada plásmido de ADN a partir de los clones transformantes y las secuencias de nucleótidos se analizaron usando el kit *Big Dye Terminator* ver. 2 (fabricado por Applied Biosystems). Como resultado del análisis de la secuencia de nucleótidos, se obtuvo un plásmido pKM2160LV4 que se muestra en la Figura 4, que tiene la secuencia de nucleótidos buscada. La *Escherichia coli* que se ha

transformado con pKM2160LV0, *Escherichia coli* DH5α/pKM2160LV0, se ha depositado como FERM BP-7713 el 22 de agosto de 2001 en la *International Patent Organism Depositary*, del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón).

A continuación, se modificaron los residuos de aminoácidos de la FR diseñados en 1(3) del Ejemplo 1 como se indica a continuación. Los codones genéticos para residuos de aminoácidos obtenidos después de la modificación se modificaron a su vez para tener los codones genéticos que se encuentran en el anticuerpo de ratón KM2160.

En la modificación de Ile en la posición 2 a Val, se obtuvo un plásmido pKM2160LV1 que se muestra en la Figura 5, que tiene la secuencia de nucleótidos buscada, realizando una reacción similar a la de la construcción del plásmido pKM2160LV0 anterior, usando un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 33 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 27. La *Escherichia coli* que se ha transformado con el plásmido pKM2160LV1, *Escherichia coli* DH5α/pKM2160LV1, se ha depositado como FERM BP-7714 el 22 de agosto de 2001 en la *International Patent Organism Depositary*, del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón).

De igual modo, se obtuvieron cada uno de los plásmidos pKM2160LV2 y pKM2160LV3 buscados, usando un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 34 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 27 cuando Val en la posición 3 se modificó a Leu, y usando un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 35 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el N° de ID de la SEC.: 27 cuando se modificaron ambos residuos mencionados. La *Escherichia coli* que

se ha transformado con el plásmido pKM2160LV2, *Escherichia coli* DH5 α /pKM2160LV2, y la *Escherichia coli* que se ha transformado con el plásmido pKM2160LV3, *Escherichia coli* DH5 α /pKM2160LV3, se han depositado el 22 de agosto de 2001 como FERM BP-7715 y FERM BP-7716, respectivamente, en la *International Patent Organism Depository*, del *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8568 Japón).

5
10 (3) Construcción del anticuerpo anti-CCR4 injertado en un vector de expresión de una CDR

Se construyó un anticuerpo anti-CCR4 injertado en un vector de expresión de una CDR pKANTEX2160Gal0LV0 usando un vector para la expresión de un anticuerpo humanizado pKANTEX93 (*Mol. Immunol.*, 37, 1035 (2000)) y se obtuvieron los plásmidos pKM2160Gal0 y pKM2160LV0 en 2(1) y (2) del Ejemplo 1 como se indica a continuación.

15 El plásmido pKM2160LV0 (3 μ g) obtenido en 2(2) del Ejemplo 1 se dejó reaccionar con 10 unidades de una enzima de restricción *Bs*WI (fabricada por New England Biolabs) a 55°C durante 1 hora y a continuación con 10 unidades de una enzima de restricción *Eco*RI (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *Bs*WI-*Eco*RI de aproximadamente 0,44 kb.

25 A continuación, se dejaron reaccionar 3 μ g del vector para la expresión de un anticuerpo humanizado pKANTEX93 con 10 unidades de una enzima de restricción *Bs*WI (fabricada por New England Biolabs) a 55°C durante 1 hora y a continuación con 10 unidades de una enzima de restricción *Eco*RI (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *Bs*WI-*Eco*RI de aproximadamente 12,75 kb.

30 A continuación, el fragmento *Bs*WI-*Eco*RI resultante derivado del plásmido pKM2160LV0 y el fragmento *Bs*WI-*Eco*RI derivado del plásmido

pKANTEX93 se ligaron usando el kit *Solution I of DNA Ligation* Ver. 2 (fabricado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. La *Escherichia coli* DH5α (fabricada por TOYOBO) se transformó usando la solución del plásmido de ADN recombinante obtenido de esta forma para
5 obtener así un plásmido pKANTEX2160LV0 que se muestra en la Figura 6.

A continuación, se dejaron reaccionar 3 µg del plásmido pKM2160Gal0 obtenido en 2(1) del Ejemplo 1 con 10 unidades de una enzima de restricción *ApaI* (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora y a continuación con 10 unidades de una enzima de restricción *NofI*
10 (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *ApaI-NofI* de aproximadamente 0,47 kb.

A continuación, se dejaron reaccionar 3 µg del plásmido pKANTEX2160LV0 obtenido anteriormente con 10 unidades de una enzima de restricción *ApaI* (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora y a
15 continuación con 10 unidades de una enzima de restricción *NofI* (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *ApaI-NofI* de aproximadamente 0,45 kb.

A continuación, el fragmento *ApaI-NofI* resultante derivado del plásmido pKM2160Gal0 y el fragmento *ApaI-NofI* derivado del plásmido pKANTEX2160LV0 se ligaron usando el kit *Solution I of DNA Ligation* Ver. 2 (fabricado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. La *Escherichia coli* DH5α (fabricado por TOYOBO) se transformó usando la
20 solución del plásmido de ADN recombinante obtenido de esta forma, y cada ADN del plásmido se preparó a partir de los clones transformantes.

Como resultado de que las secuencias de nucleótidos de los plásmidos así obtenidos se analizaran usando el kit *Big Dye Terminator* ver. 2 (fabricado por Applied Biosystems) se confirmó que se había obtenido un
30 vector de expresión pKANTEX2160Gal0LV0 que se muestra en la Figura 6 en el que se había clonado el ADN buscado.

Además, los vectores de expresión se prepararon usando el mismo método en la VH y en la VL en el que se modificaron los residuos de aminoácidos de otras FR, incluida HV0.

Específicamente, se construyeron 22 vectores de expresión

5 pKM2160Gal0LV0, pKM2160Gal0LV1, pKM2160Gal0LV2,
pKM2160Gal0LV3, pKM2160Gal1LV1, pKM2160Gal1LV3,
pKM2160Gal2LV1, pKM2160Gal2LV3, pKM2160Gal3LV1,
pKM2160Gal3LV3, pKM2160HV0LV0, pKM2160HV0LV1, pKM2160HV0LV2,
pKM2160HV0LV3, pKM2160HV1LV0, pKM2160HV1LV1, pKM2160HV1LV2,
10 pKM2160HV1LV3, pKM2160HV2LV0, pKM2160HV2LV3, pKM2160HV3LV0 y
pKM2160HV3LV3 combinando respectivamente pKM2160Gal0,
pKM2160Gal1, pKM2160Gal2, pKM2160Gal3, pKM2160HV0, pKM2160HV1,
pKM2160HV2 y pKM2160HV3 construidos en 2(1) del Ejemplo 1 con
pKM2160LV0, pKM2160LV1, pKM2160LV2 y pKM2160LV3 construidos en
15 2(2) del Ejemplo 1.

Ejemplo 2

Expresión del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR en células animales:

20

1. Expresión transitoria del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR usando células COS-7 (ATCC CRL 1651)

(1) Expresión transitoria en células COS-7

En una placa de 6 pocillos (fabricada por Iwaki Glass) se dispensaron

25 1 x 10⁵ células/ml de células COS-7 en 2 ml/pocillo usando como medio DMEM (fabricado por Gibco) que contiene FCS al 10% y se cultivó toda la noche a 37°C. Por cada 100 µl de medio OPTI-MEM (fabricado por Gibco) se añadieron 3 µl de reactivo de transferencia Fu-GENETM 6 (fabricado por Roche) y posteriormente 1 µg de cada uno de los 22 vectores de expresión

30 del anticuerpo anti-CCR4 injertado en la CDR obtenidos en la sección 2(3) del Ejemplo 1, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante

15 minutos para formar un complejo ADN-liposoma. Cada una de las soluciones de reacción se añadió gota a gota a las células COS-7 anteriores y se mezcló bien, cultivándose a continuación a 37°C. Después del cultivo durante 72 horas se recuperó el sobrenadante de los cultivos y se evaluó la actividad del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR en el sobrenadante de los cultivos.

(2) Evaluación de la reactividad del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR frente a CCR4

10 La actividad del sobrenadante resultante de los cultivos de 22 anticuerpos se evaluó como se indica a continuación.

El Compuesto 1 (Nº de ID de la SEC.: 37) se seleccionó como péptido de la región extracelular de la CCR4 que puede reaccionar con el anticuerpo quimérico KM2760 anti-CCR4 producido por el transformante KM2760 (FERM BP-7054) preparado en el Ejemplo de Referencia 2. Para usar el Compuesto 1 en la medición de la actividad mediante ELISA se preparó su conjugado con BSA (albúmina sérica bovina) (fabricado por Nakalai Tesque) y se usó como antígeno. Para ello, se añadieron 100 ml de una solución de 25 mg/ml de SMCC (éster N-hidroxisuccinimida del ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxílico) (fabricado por Sigma)-DMSO gota a gota a 900 ml de una solución de PBS que contiene 10 mg de BSA con agitación con vortex y se mezcló suavemente durante 30 minutos. A una columna de filtración en gel, por ejemplo una columna NAP-10 o similar, equilibrada con 25 ml de PBS, se aplicó 1 ml de la solución de reacción y el eluido obtenido con 1,5 ml de PBS se usó como solución BSA-SMCC (la concentración de BSA se calculó midiendo con A_{280}). A continuación se añadieron 250 ml de PBS a 0,5 mg del Compuesto 1 que se disolvió completamente a continuación añadiendo 250 ml de DMF, y se añadió a continuación la solución BSA-SMCC anterior (contenido de BSA: 1,25 mg) con agitación con vortex y se mezcló suavemente durante 3 horas. La solución de reacción se dializó durante toda la noche a 4°C frente a PBS, se

añadió azida sódica a la solución para obtener una concentración final del 0,05% y a continuación la mezcla resultante se filtró usando un filtro de 0,22 mm para obtener la solución de BSA-Compuesto 1.

En una placa de ELISA de 96 pocillos (fabricada por Greiner) se
5 dispensaron 0,05 µg/ml del conjugado preparado en alícuotas de 50 µl/pocillo y se dejó reposar a 4°C toda la noche para su adsorción. Después de lavar con PBS, se añadió PBS que contiene BSA al 1% (denominado en lo sucesivo "BSA-PBS 1%") en alícuotas de 100 µl/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear los grupos activos
10 residuales. Después de lavar cada pocillo con PBS que contiene Tween 20 al 0,05% (denominado en lo sucesivo "Tween-PBS"), se añadió un sobrenadante del cultivo del transformante en alícuotas de 50 µl/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción y posterior lavado de cada pocillo con Tween-PBS se añadió una
15 solución de peroxidasa-anticuerpo de cabra anti-IgG(γ) humana marcada (fabricado por American Qualex) diluida 6.000 veces con BSA-PBS al 1% como solución del anticuerpo secundario en alícuotas de 50 µl/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción y posterior lavado con Tween-PBS, se añadió una solución del
20 sustrato ABTS (una solución preparada disolviendo 0,55 µg de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico amónico en 1 µl de tampón citrato 0,1 M (pH 4,2) y añadiendo 1 µl/ml de peróxido de hidrógeno inmediatamente antes de su uso) a 50 µl/pocillo para desarrollar el color, y la reacción se interrumpió 20 minutos después al añadir una solución de SDS al 5% en
25 alícuotas de 50 µl/pocillo. A continuación se midió la absorbancia a 415 nm.

Además, para comparar las concentraciones del anticuerpo IgG humano producido en el sobrenadante de los cultivos se usó como antígeno un anticuerpo de cabra anti-IgG(γ) humana (fabricado por American Qualex) diluido 2.000 veces con PBS.

30 Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8. Cada anticuerpo frente a CCR4 injertado en la CDR mostró casi la misma actividad que el

anticuerpo KM2760 quimérico humano.

2. Expresión estable del anticuerpo anti-CCR4 Injertado en una CDR usando células animales

5 Se expresó un anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR en células animales usando el anticuerpo anti-CCR4 injertado en un vector de expresión de una CDR obtenido en 2(3) del Ejemplo 1 como se indica a continuación.

10 (1) Expresión estable en la línea celular del mieloma de rata YB2/O (ATCC CRL 1581)

 Cada plásmido de expresión del anticuerpo humano injertado en una CDR se elaboró en estado lineal mediante su digestión con una enzima de restricción AafII (fabricada por TOYOBO), se introdujeron 10 µg del producto digerido en 4×10^6 células de la línea celular del mieloma de rata YB2/O (ATCC CRL 1581) mediante electroporación (Cytotechnology, 3, 133 (1990)), y a continuación las células se suspendieron en 40 ml de medio H-SFM (fabricado por GIBCO-BRL) (suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 5%) y se dispensaron en alícuotas de 200 µl/pocillo en una placa de microvaloración de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite). Después de cultivar a 37°C durante 1 a 3 días en una incubadora con CO₂ al 5%, se añadió G418 (fabricado por Nakalai Tesque) a la solución con una concentración de 1 mg/ml y el cultivo continuó durante 1 a 2 semanas hasta obtener los transformantes resistentes a G418.

25 El sobrenadante de los cultivos se recuperó de los pocillos en los que las colonias de los transformantes mostraban resistencia a G418 se hicieron confluentes, y se midieron las actividades de unión al antígeno de los anticuerpos anti-CCR4 humanos injertados en una CDR en el sobrenadante de los cultivos mediante el método ELISA que se muestra en 1(2) del Ejemplo 2.

30 Para aumentar la cantidad de expresión del anticuerpo usando un sistema de amplificación del gen dhfr, los transformantes de los pocillos en

los que se encontró expresión de un anticuerpo quimérico anti-CCR4 en el sobrenadante de los cultivos se suspendieron para obtener una densidad de de 1 a 2×10^5 células/ml en medio H-SFM que contiene 1 mg/ml de G418 y 50 nM de metotrexato (denominado en lo sucesivo "MTX") que es un

5 Inhibidor de la dihidrofolato reductasa del producto del gen dhfr y se dispensaron en alícuotas de 1 ml en una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). Los transformantes que mostraban resistencia a MTX 50 nM se indujeron mediante cultivo a 37°C durante 1 a 2 semanas en una incubadora con CO₂ al 5%. Cuando los transformantes fueron confluentes en los pocillos,

10 se midieron las actividades de unión al antígeno de los anticuerpos anti-CCR4 humanos injertados en una CDR en el sobrenadante de los cultivos mediante el método de ELISA que se muestra en 1(2) del Ejemplo 2. Con respecto a los transformantes de pocillos en los que se encontró en el sobrenadante la expresión de los anticuerpos anti-CCR4 humanos injertados

15 en una CDR, la concentración de MTX aumentó hasta 100 nM y a continuación hasta 200 nM con el método descrito anteriormente, y se obtuvo finalmente un transformante capaz de crecer en un medio H-SFM que contiene 1 mg/ml de G418 y MTX 200 nM y también es capaz de expresar en gran cantidad el anticuerpo humano anti-CCR4 injertado en la CDR. Para el

20 transformante así obtenido se realizó un aislamiento de una sola célula (clonación) mediante el análisis de dilución limitante hasta obtener un clon de célula transformante que muestra la expresión más alta del anticuerpo humano anti-CCR4 injertado en una CDR. La célula KM8760 productora de anticuerpo obtenida por la transferencia génica de un vector de expresión

25 pKANTEX2160Gal1LV3 y la célula KM8759 productora del anticuerpo obtenida por la transferencia génica de un vector de expresión pKANTEX2160Gal2LV3 se han depositado el 30 de julio de 2002 como FERM BP-8130 y FERM BP-8129, respectivamente, ante la *International Depositary Authority* de la *International Patent Organism Depositary*, del

30 *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST Tsukuba Central 8, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566

Japón).

(2) Purificación del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR a partir del sobrenadante del cultivo

- 5 Cuando apareció un transformante que mostraba resistencia G418 y se hizo confluyente, se cambió el medio a 300 a 1.100 ml de medio H-SFM que contenía GF21 de Daigo (fabricado por Wako Pure Chemical Industries) en una concentración del 5%, seguido por el cultivo durante 3 a 5 días. Cuando se hizo confluyente se recuperó el sobrenadante del cultivo. Se
- 10 obtuvo una proteína purificada mediante purificación del anticuerpo anti-CCR4 injertado en la CDR a partir aproximadamente de 300 a 1.100 ml del sobrenadante del cultivo usando una columna Prosep-A (fabricada por Millipore) según las instrucciones adjuntas.

- 15 3. Evaluación de la actividad del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR purificado

- La actividad se evaluó usando el anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR derivado de las células productoras del anticuerpo obtenidas por la introducción de los vectores de expresión de Gal0LV0, Gal0LV1, Gal0LV3,
- 20 Gal1LV1, Gal1LV3, Gal2LV1, Gal2LV3, Gal3LV1 y Gal3LV3 en células YB2/0 (denominadas en lo sucesivo simplemente como "Gal0LV0", "Gal0LV1", "Gal0LV3", "Gal1LV1", "Gal1LV3", "Gal2LV1", "Gal2LV3", "Gal3LV1" y "Gal3LV3", respectivamente).

- 25 (1) Medición de la actividad de unión del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR frente a CCR4 (método ELISA)

- La medición se realizó de la misma forma que el método descrito en el apartado 1(2) del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Figura 9. Cada anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR mostró casi la misma
- 30 actividad que el anticuerpo humano quimérico KM2760.

(2) Reactividad del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR con células

de expresión alta de CCR4 (técnica de anticuerpos fluorescentes)

En una placa de 96 pocillos se dispensaron 2×10^5 o más células CCR4/EL-4 células, células de alta expresión de CCR4 obtenidas en el Ejemplo de Referencia 3. Se preparó una solución del anticuerpo diluyendo cada uno de los anticuerpos purificados y una inmunoglobulina humana (fabricada por Welfide) para prevenir la tinción inespecífica, hasta obtener concentraciones de 10 µg/ml y 3,75 mg/ml, respectivamente, con un tampón para FACS, y se añadió la solución del anticuerpo en alícuotas de 100 µl/pocillo y se dejó reaccionar durante 30 minutos en hielo. Como control negativo se usaron 10 µg/ml de un anticuerpo de cadena α antirreceptor de IL-5 humano (WO 97/10354). Después de lavar dos veces 200 µl/pocillo del tampón para FACS, se añadió un anticuerpo anti-IgG humano marcado con PE (fabricado por Coulter) diluido 100 veces en alícuotas de 50 µl/pocillo. Después de la reacción en hielo protegido de la luz y el posterior lavado tres veces con 200 µl/pocillo del tampón para FACS, el producto de la reacción se suspendió en 500 µl del tampón para FACS y se midió la intensidad de la fluorescencia usando un citómetro de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 10. Todos los anticuerpos anti-CCR4 injertados en la CDR mostraron casi la misma actividad que el anticuerpo quimérico humano KM2760.

20

(3) Medición de la actividad del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR para unirse a la CCR4 (método BIAcore)

Para medir la actividad de unión con más detalle, se midió la actividad de unión de varios anticuerpos purificados usando el equipo BIAcore 2000 (fabricado por BIACORE) como se indica a continuación. En este caso se usó HBS-EP (fabricado por BIACORE) como tampón para diluir las muestras y para la medición. En primer lugar, se añadieron 5 µl de una solución con 0,05 µg/ml del Compuesto 1 como péptido parcial CCR4 biotinilado a un Sensor Tip SA (fabricado por BIACORE) con un flujo de 5 µl/minuto y se inmovilizaron en la punta del sensor.

30

A la punta del sensor inmovilizado con el compuesto 1 biotinilado

preparado se añadieron 20 µl de una solución de 4 µg/ml de cada uno de los anticuerpos purificados con un flujo de 5 µl/minuto, y después de completar la adición se monitorizó la reacción de disociación durante 4 minutos y a continuación se regeneró la superficie de la punta del sensor añadiendo dos veces 5 µl de HCl 10 mM. De esta forma se obtuvo una curva de la reacción de unión (sensorgrama) para el Compuesto 1.

Los resultados se muestran en la Figura 11. La ordenada representa una unidad de resonancia (RU) que representa un cambio de masa en la punta del sensor. Por ejemplo, 1.000 RU se corresponden a un cambio de masa de aproximadamente 1 ng/mm² de proteína. Se demostró que el anticuerpo KM2760 tiene una actividad de unión alta y muy estable porque mostró una actividad de unión dependiente del tiempo para el Compuesto 1 y la disociación de su unión apenas se encontró en la reacción de disociación. Por otro lado, cada anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR mostró casi la misma reacción de disociación que el anticuerpo quimérico humano KM2760, pero se encontró un ligero descenso de la actividad en la reacción de unión a un péptido CCR4 parcial, el Compuesto 1. El anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR Gal0LV0 en la que se injertó la CDR sola mostró la actividad de unión más baja y la actividad de unión aumentó con la modificación del residuo de aminoácidos de la FR. Los resultados muestran que se puede preparar un anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR que mantiene una actividad de unión al antígeno y una especificidad de unión a anticuerpo de ratón injertando la CDR del anticuerpo de ratón KM2160 a la FR de un anticuerpo humano apropiado, y que se puede preparar un anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR que tiene la mayor actividad de unión si, a partir de la estructura tridimensional, y similares, se identifican los residuos de aminoácidos de la FR que son importantes para la actividad de unión de las regiones V del anticuerpo y se injertan junto con la CDR. Se espera que el anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR preparado según este Ejemplo tenga una actividad de unión alta a la CCR4, con una inmunogenicidad disminuida en el hombre comparada con la de los

anticuerpos de ratón y también con la de los anticuerpos quiméricos humanos, y con una seguridad alta y efectos terapéuticos también elevados.

2. Actividad citotóxica *in vitro* del anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR
5 (actividad ADCC)

Para evaluar la actividad citotóxica *in vitro* del anticuerpo purificado anti-CCR4 injertado en una CDR obtenida en el apartado 2(2) del Ejemplo 2 se midió su actividad ADCC como se indica a continuación.

10 (1) Preparación de la suspensión de células diana

Las células CCR4/EL-4 que expresan en gran cantidad la CCR4 obtenidas en el Ejemplo de Referencia 3 se cultivaron en medio RPMI 1640 que contiene el medio con FCS al 10% (fabricado por GIBCO) con 0,5 mg/ml de G418 para obtener una densidad de 1×10^6 células/0,5 ml; a la mezcla se
15 añadieron 1,85 MBq equivalentes de cromato sódico radiactivo ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) (fabricado por Daiichi Pure Chemicals) y se dejó reaccionar a 37°C durante 1,5 horas para marcar las células con el isótopo. Después de la reacción las células se lavaron tres veces mediante suspensión en el medio RPMI 1640 y centrifugación posterior, se resuspendieron en el medio y a continuación se
20 incubaron en hielo a 4°C durante 30 minutos para liberar espontáneamente la sustancia radiactiva. Después de la centrifugación se añadieron de nuevo 5 ml de RPMI 1640 con FCS al 10% para obtener una densidad de 2×10^5 células/ml como suspensión de las células diana.

25 (2) Preparación de la suspensión de células efectoras

Se obtuvo sangre periférica (60 ml) de personas sanas usando una jeringa que contiene 200 unidades (200 µl) de una solución inyectable de heparina sódica (fabricada por Takeda Pharmaceutical). Toda la cantidad se llevó hasta 120 ml diluyéndola dos veces con el mismo volumen de solución
30 salina fisiológica (fabricada por Otsuka Pharmaceutical). Se dispensó Lymphoprep (fabricado por NYCOMED) en alícuotas de 5 ml en 12 tubos de

centrífuga de 15 ml de capacidad (fabricados por Sumitomo Bakelite), superponiéndose a continuación la sangre periférica diluida en alícuotas de 10 ml, y la mezcla se centrifugó 800 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las fracciones de PBMC que quedaron entre la capa de plasma sanguíneo y la capa de Lymphoprep se recogieron en todos los tubos de centrífuga, se suspendieron en medio RPMI 1640 con FCS al 1% (denominado en lo sucesivo "FCS-RPMI al 1%"), se lavaron dos veces centrifugando a 400 x g y 4°C durante 5 minutos y a continuación se resuspendieron para obtener una densidad de 5×10^6 células/ml, que se van a usar como células efectoras.

(3) Medición de la actividad ADCC

La suspensión de células diana preparadas en (1) se dispensó en alícuotas de 50 μ l (1×10^4 células/pocillo) en los pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U (fabricada por Falcon). A continuación se dispensó la suspensión de células efectoras preparadas en (2) en alícuotas de 100 μ l (5×10^5 células/pocillo, siendo la relación entre las células efectoras y las células T diana de 50 : 1). A continuación, se añadió cada anticuerpo quimérico anti-CCR4 para obtener una concentración final de 0,1 ng/ml a 10 μ g/ml y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 4 horas. Después de la reacción, la placa se centrifugó y se midió la cantidad de ^{51}Cr en 100 μ l del sobrenadante en cada pocillo con un contador γ . La cantidad del ^{51}Cr disociado espontáneamente se calculó del mismo modo que antes, usando el medio solo en lugar de la suspensión de células efectoras y la solución del anticuerpo, y midiendo la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante. La cantidad de ^{51}Cr total disociado se calculó de la misma forma que antes, añadiendo el medio solo en lugar de la solución del anticuerpo, y ácido clorhídrico 1 N en lugar de la suspensión de células efectoras, y midiendo la cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante. La actividad ADCC se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad ADCC (\%)} = \frac{(\text{cantidad de } ^{51}\text{Cr en el sobrenadante de la muestra}) - (\text{cantidad de } ^{51}\text{Cr liberado espontáneamente})}{(\text{cantidad de } ^{51}\text{Cr total}) - (\text{cantidad de } ^{51}\text{Cr liberado espontáneamente})} \times 100$$

Los resultados se muestran en la Figura 12. Como se ve en la Figura 12, el anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR tenía una actividad citotóxica importante dependiente de la concentración del anticuerpo.

5

5. Efecto de la inhibición de la producción de citocina a partir de PBMC humanos

Se examinó un efecto de inhibición de la producción de citocinas usando un anticuerpo anti-CCR4 injertado en la CDR de Gal1, LV3 y un anticuerpo quimérico KM2760. Como control negativo se usó un anticuerpo anti-IL-5R.

Las PBMC se separaron de la misma manera que en el apartado 4(2) del Ejemplo 2 y se dispensaron en alícuotas de 1×10^6 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U, añadiéndose después un anticuerpo de evaluación para obtener una concentración final de 1 µg/ml, y el volumen total se ajustó a 200 µl/pocillo. La actividad ADCC se indujo mediante el cultivo simultáneo a 37°C durante 24 horas en un chorro de CO₂ al 5%. Después del cultivo se extrajeron 100 µl del sobrenadante y se añadieron 100 µl de un medio que contiene 100 ng/ml de PMA (acetato de forbol miristato) y 2 µg/ml de ionomicina (fabricado por SIGMA) para obtener unas concentraciones finales de 50 ng/ml de PMA y 1 µg/ml de ionomicina, y las células se estimularon para inducir la producción de citocinas. Después de la introducción de cada estimulante se realizó el cultivo durante 24 horas, se extrajo el sobrenadante de los cultivos y se midieron IL-4, IL-13 e interferón (IFN)-γ usando un kit de determinación de citocinas (fabricado por Biosource). El cociente de inhibición de la producción se calculó definiendo

cada producción de citocinas en ausencia del anticuerpo como un cociente de inhibición del 0%, y los resultados se muestran en la Figura 13. Como se muestra en la Figura 13, similar a lo comentado en el anticuerpo quimérico KM2760, el grupo Gal1LV3 añadido al anticuerpo anti-CCR4 injertado en la CDR Inhibió la producción de las citocinas Th2 IL-4 e IL-13 pero tuvo poca influencia en la citocina Th1 IFN- γ .

Los resultados muestran que cada anticuerpo anti-CCR4 injertado en una CDR puede deplecionar o eliminar las células Th2 que expresan CCR4 activando eficientemente las células humanas efectoras y, como resultado, tiene un efecto inhibitor de la producción de citocinas Th2 a partir de las células Th2 y, por lo tanto, es útil en el diagnóstico o tratamiento de las enfermedades inmunes mediadas por Th2 en el hombre, como asma bronquial, dermatitis atópica, y similares.

6. Análisis de la reactividad frente a plaquetas humanas.

(1) Separación de las plaquetas humanas

Se añadió citrato sódico 3,2% al 1/10 en volumen a una muestra de sangre obtenida en una persona sana y se mezcló bien. La sangre se dispensó en alícuotas de 5 ml en tubos de 15 ml de capacidad (fabricados por Greiner) y se centrifugó a 90 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se recogieron y se centrifugaron de nuevo a 1.950 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de desechar el sobrenadante los pellet se resuspendieron en el tampón para FACS y se centrifugó a 1.190 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente para lavar los pellet. Los pellet se resuspendieron de nuevo en el tampón para FACS y se centrifugó del mismo modo, y a continuación se ajustaron las plaquetas del pellet para obtener una densidad de aproximadamente 1×10^7 pellets/ml usando el tampón para FACS.

(2) Tinción de la plaqueta

Cada uno de los anticuerpos purificados anti-CCR4 humanos injertados en una CDR obtenidos en el Ejemplo 2 se añadieron a 100 µl de la suspensión de plaquetas obtenida en el apartado 6(1) para obtener una concentración de 10 µg/100 µl y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Como controles comparativos se dejaron reaccionar cada uno de los anticuerpos quiméricos humanos KM2760 anti-CCR4 y un anticuerpo de ratón anti-1G1 (fabricado por Pharmingen) con 100 ml de la suspensión de plaquetas en la misma concentración. Después de la reacción se añadieron 2 ml del tampón para FACS a cada tubo de 15 ml de capacidad y la mezcla se agitó y a continuación se lavó centrifugando a 840 x g durante 5 minutos a 4°C. Después de desechar el sobrenadante se repitió la misma operación. Se añadió el anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con PE (fabricado por Coulter) diluido 50 veces con el tampón para FACS a 20 µl del tubo que contiene una muestra que ha reaccionado con cada uno de los anticuerpos humanos injertados en una CDR y KM2760 y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Con respecto al tubo que contiene la mezcla que reaccionó con el anticuerpo 1G1, se añadieron de nuevo 20 µl del anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con PE (fabricado por DAKO) diluido 50 veces y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad.

Después de la reacción se añadieron 2 ml del tampón para FACS a cada tubo, agitándose después y lavándose la mezcla por centrifugación a 840 x g durante 5 minutos a 4°C. Después de desechar el sobrenadante se repitió de nuevo la misma operación. Después de suspender el residuo en 500 µl del tampón para FACS se midió la intensidad de la fluorescencia con un citómetro de flujo EPICS x L-MCL (fabricado por Beckman Coulter).

Los resultados se muestran en la Figura 14. El anticuerpo 1G1 usado como control comparativo demostró reactividad con las plaquetas, pero todos los anticuerpos anti-CCR4 humanos injertados en una CDR no mostraron una reactividad específica con las plaquetas humanas, igual que el anticuerpo quimérico humano KM2760 anti-CCR4.

Ejemplo de Referencia 1

Preparación de células de hibridoma que producen anticuerpo monoclonal anti-CCR4 de ratón:

- 5 Las células de hibridoma que producen el anticuerpo monoclonal KM2160 anti-CCR4 de ratón (*Int. Immunol.*, 11, 81 (1999)) se prepararon según el procedimiento siguiente.

(1) Preparación del antígeno

- 10 La secuencia de aminoácidos (Nº de ID de la SEC.: 48) de la proteína de la CCR4 (denominada en lo sucesivo "hCCR4") se analizó utilizando un equipo Genetyx Mac, y se seleccionó el Compuesto 2 (Nº de ID de la SEC.: 36) como la secuencia parcial que se consideraba apropiada como el antígeno entre las partes que tienen una hidrofilia alta, los extremos N-
15 terminal y C-terminal.

(2) Preparación del inmunógeno

- El péptido parcial hCCR4 obtenido en (1) del Ejemplo de Referencia 1 se usó como el inmunógeno después de preparar su conjugado con KLH
20 (Calbiochem) con el método siguiente para aumentar su inmunogenicidad. Específicamente, se disolvió KLH en PBS para obtener una concentración de 10 mg/ml, añadiéndose a esta mezcla 25 mg/ml de MBS (fabricado por Nakalai Tesque) en un volumen 1/10 gota a gota, y la mezcla se dejó reaccionar agitando durante 30 minutos. La MBS libre se extrajo mediante
25 una columna de filtración en gel como una columna Sephadex G-25 que se había equilibrado con PBS o similar, y se mezclaron 2,5 mg de la mezcla KLH-MB resultante con 1 mg del péptido disuelto en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0), seguido por agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de la reacción, la mezcla se dializó frente a PBS.

- 30 (3) Inmunización de un animal y producción de las células productoras del anticuerpo

Se administraron 100 µg del conjugado péptido-KLH preparado en (2) del Ejemplo de Referencia 1 a ratones hembra (Balb/c) de 5 semanas de edad junto a 2 mg de gel de aluminio y 1×10^6 células de vacuna frente a la tos ferina (fabricada por Chiba Serum Institute), y 2 semanas más tarde se administraron 100 µg del conjugado una vez por semana hasta un total de 4 veces. Se extrajo una muestra de sangre de cada animal del plexo venoso del fondo de ojo y se analizó el título sérico mediante el enzimoimmunoensayo descrito anteriormente, y 3 días después de la última inmunización se extrajo el bazo de un ratón que mostró un título suficiente de anticuerpos. El bazo se escindió en un ratón en el tercer día después de la administración final y se cortó en piezas de MEM (fabricado por Nissui Pharmaceutical), y las células se liberaron usando unas pinzas y centrifugando el tejido (1.200 rpm, 5 minutos), se extrajo el sobrenadante y después se trató con 3 ml de un tampón Tris-cloruro amónico (pH 7,85) durante 1 a 2 minutos para eliminar los hematíes. Las células residuales se lavaron de nuevo tres veces con MEM y se usaron para la fusión celular.

(4) Preparación de células de mieloma de ratón

Se cultivó una línea de células de mieloma de ratón P3X63Ag8U.1 (ATCC CRL-1597, denominadas en lo sucesivo "P3-U1") resistente a 8-azaguanina y se usó como la línea progenitora en la fusión celular.

(5) Preparación de células de hibridoma

Las células de bazo y las células de mieloma obtenidas en (3) y (4) en el Ejemplo de Referencia 1 se mezclaron en una relación 10:1, centrifugándolas después (1.200 rpm, 5 minutos) para extraer el sobrenadante, y añadiéndose 0,5 ml de una solución de polietilenglicol (una solución que contiene 2 g de polietilenglicol-1000, 2 ml de MEM y 0,7 ml de DMSO) a las células que han precipitado de esta forma por cada 10^6 células de bazo a 37°C, seguido por una suspensión cuidadosa. A continuación se añadieron 1 a 2 ml de MEM varias veces a intervalos de 1 a 2 minutos, y se

ajustó el volumen final a 50 ml con MEM. Después de extraer el sobrenadante por centrifugación (900 rpm, 5 minutos), el precipitado se suspendió en 100 ml de medio HAT, dispensado en alícuotas de 100 µl/pocillo en una placa de microvaloración de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite), seguido por el cultivo en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C durante 10 a 14 días. Se midió la actividad de unión al péptido parcial hCCR4 (Compuesto 2) en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA (*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Capítulo 14 (1988), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited (1986), etc.) usando pocillos en los que se observó la propagación de las células fusionadas. Cada pocillo en el que se confirmó la actividad se clonó un total de 2 veces de dilución limitante, una vez cambiando el medio a un medio HT y cambiando a continuación al medio normal. De esta forma, se obtuvieron células de hibridoma KM2160 que producen el anticuerpo de ratón KM2160. Este anticuerpo KM2160 reacciona específicamente con un péptido parcial hCCR4 (Compuesto 2).

Ejemplo de Referencia 2

Preparación del anticuerpo quimérico anti-CCR4:

20

1. Aislamiento y análisis del ADNc que codifica la región V del anticuerpo anti-CCR4 de ratón:

(1) Preparación del ARNm de células de hibridoma que producen el anticuerpo anti-CCR4 de ratón

25

Se preparó un ARNm a partir de las células de hibridoma KM2160 que se describen en el Ejemplo de Referencia 1. Se prepararon aproximadamente 48 µg de ARNm a partir de 8×10^7 células de hibridoma KM2160 usando un kit de preparación de ARNm, kit *Fast Track mRNA Isolation* (fabricado por Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

30

(2) Preparación de la cadena H y de la cadena L de la librería de ADNc del anticuerpo anti-CCR4 de ratón

Se sintetizó el ADNc que tiene adaptadores *EcoRI*-*NotI* en ambos extremos a partir de 5 µg del ARNm de KM2160 obtenido en 1(1) del Ejemplo de Referencia 2 usando el kit *ADNc Synthesis* (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante. El ADNc preparado de esta manera se disolvió en 20 µl de agua estéril y se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperaron fragmentos del ADNc de aproximadamente 1,5 kb correspondientes a la cadena H del anticuerpo de tipo IgG y fragmentos del ADNc de aproximadamente 1,0 kb correspondientes a la cadena L del tipo k, respectivamente, usando el kit *QIA quick Gel Extraction* (fabricado por QIAGEN). A continuación, usando el kit *λZAPII Predigested EcoRI/ClaP-Treated Vector* (fabricado por Stratagene), se ligaron cada 0,1 µg de los fragmentos del ADNc de aproximadamente 1,5 kb y 0,1 µg de los fragmentos del ADNc de aproximadamente 1,0 kb a 1 µg del vector *λZAPII* que se había digerido con una enzima de restricción *EcoRI* y se defosforilaron en sus extremos con fosfatasa alcalina de intestino de ternera según las instrucciones del fabricante. En el fago I se introdujeron 2,5 µl de cada solución de reacción después del ligamiento, usando un *GigapackIII Gold Packaging Extract* (fabricado por Stratagene) según las instrucciones del fabricante, y a continuación se infectó *Escherichia coli* XL1-Blue (*Biotechniques*, 5, 378 (1987)) con una cantidad apropiada del fago para obtener $9,3 \times 10^4$ clones del fago como la librería de ADNc de la cadena H del anticuerpo KM2160 y $7,4 \times 10^4$ clones del fago como la librería de ADNc de la cadena L. A continuación, cada fago se fijó en un filtro de membrana de nailon Hybond-N+ (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante.

(3) Clonación del ADNc de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo anti-CCR4 de ratón

Usando el equipo *ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection*

System (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech), según las instrucciones del fabricante, se detectaron los clones en los filtros de la membrana de nailon de la librería de ADNc de la cadena H del anticuerpo KM2160 y de la librería de ADNc de la cadena L preparadas en 1(2) del Ejemplo de Referencia 2 usando el ADNc de la región C de un anticuerpo de ratón (la cadena H es un fragmento *BamHI-EcoRI* del ADNc Cy1 de ratón (*EMBO J.*, 3, 2047 (1984)), la cadena L es un fragmento *HpaI-EcoRI* del ADNc Ck (*Cell*, 22, 197 (1980)) como sonda, y se obtuvieron los clones del fago que se unieron fuertemente a la sonda como 10 clones para cada cadena H y cada cadena L. A continuación, cada clon de fago se convirtió en el plásmido mediante un método de excisión *in vivo* usando el *λ ZAPII Cloning Kit* según las instrucciones del fabricante (fabricado por Stratagene). Mediante el kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction* (fabricado por PE Biosystems) se analizó la secuencia de nucleótidos del ADNc contenida en cada plásmido obtenido de esta forma mediante un equipo secuenciador de ADN *ABI PRISM 377* del mismo fabricante, según las instrucciones del fabricante. Como resultado se obtuvieron un plásmido pKM2160H4 que contiene un ADNc de la cadena H de longitud funcional completa y un plásmido pKM2160L6 que contiene un ADNc de la cadena L, en cuyo extremo 5'-terminal había una secuencia ATG considerada el codón de inicio.

(4) Análisis de la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo anti-CCR4 de ratón

Los N° de ID de las SEC.: 61, 62, 63 y 64, respectivamente, representan una secuencia completa de nucleótidos de la región V de la cadena H contenida en el plásmido pKM2160H4, una secuencia completa de aminoácidos de la región V de la cadena H deducida a partir de ella, una secuencia completa de nucleótidos de la región V de la cadena L contenida en el plásmido pKM2160L6 y una secuencia completa de aminoácidos de la región V de la cadena L deducida a partir de ella. Según la comparación con

los datos de la secuencia de los anticuerpos de ratón conocidos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services (1991)) con los resultados del análisis del extremo N-terminal de las secuencias de aminoácidos de las cadenas H y L del anticuerpo anti-CCR4 de ratón KM2160 purificado usando un secuenciador de proteínas (PPSQ-10, 5 fabricado por Shimadzu), se encontró que cada ADNc aislado de esta forma es un ADNc de longitud completa que codifica el anticuerpo anti-CCR4 de ratón KM2160 que contiene las secuencias de la señal secretora que son los aminoácidos de las posiciones 1-19 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 15 en la cadena H y los 10 aminoácidos de las posiciones 1-19 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 25 en la cadena L.

A continuación, se examinó si las secuencias de aminoácidos de las regiones V de las cadenas H y L del anticuerpo anti-CCR4 de ratón KM2160 15 eran novedosas. Con el programa GCG (versión 9.1, fabricado por Genetics Computer Group) como sistema de análisis de las secuencias, se investigaron las bases de datos de secuencias de aminoácidos de las proteínas conocidas investigadas por el método BLAST (*Nucleic Acids Res.*, 25, 3389 (1997)). Como resultado, no se encontraron secuencias de 20 coincidencia completa tanto para la cadena H como para la cadena L, de forma que se confirmó que la región V de la cadena H y la región V de la cadena L del anticuerpo anti-CCR4 de ratón KM2160 son una novedad.

Además, se identificaron las CDR de la región V de la cadena H y de la región V de la cadena L del anticuerpo anti-CCR4 de ratón KM2160 25 comparando con las secuencias de aminoácidos de anticuerpos conocidos. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 en la región V de la cadena H del anticuerpo anti-CCR4 de ratón KM2160 están representadas por los N° de ID de las SEC.: 1, 2 y 3, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 en la región V de la cadena L por los 30 N° de ID de las SEC.: 5, 6 y 7, respectivamente.

2. Expresión estable del anticuerpo quimérico anti-CCR4 usando una célula animal

5 (1) Construcción del vector de expresión pKANTEX2160 del anticuerpo quimérico anti-CCR4

Se construyó un vector de expresión pKANTEX2160 del anticuerpo quimérico anti-CCR4 como se indica a continuación, usando un vector de expresión del anticuerpo humanizado pKANTEX93 que expresa una IgG1 humana y un anticuerpo de tipo k y los plásmidos pKM2160H4 y pKM2160L6
10 obtenidos en 1(3) del Ejemplo de Referencia 2.

Se diseñó un ADN sintético que tiene las secuencias de nucleótidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 65 y 66 para obtener el ADNc de la región V de la cadena H del anticuerpo KM2160 mediante PCR, y otro ADN sintético que tiene las secuencias de nucleótidos representadas por los
15 N° de ID de las SEC.: 67 y 68 para obtener el ADNc de la región V de la cadena L. Cada ADN sintético contiene una enzima de restricción que reconoce la secuencia en su extremo 5'-terminal para su clonación en pKANTEX93, y la síntesis del ADN fue encomendada a Genset Inc. El plásmido pKM2160H4 (20 ng) obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo de
20 Referencia 2 se añadió a un tampón que contenía 50 µl del tampón de PCR N° 1 unido a polimerasa KOD DNA (fabricada por TOYOBO), dNTP 0,2 mM, cloruro de magnesio 1 mM y ADN sintético 0,5 µM que contiene las secuencias de nucleótidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 11 y 12, y la mezcla se calentó a 94°C durante 3 minutos. Después se añadieron
25 2,5 unidades de polimerasa KOD DNA (fabricada por TOYOBO), la mezcla se sometió a 25 ciclos de reacción, consistiendo cada ciclo en el calentamiento a 94°C durante 30 segundos, a 58°C durante 30 segundos y a 74°C durante 1 minuto, usando un ciclador térmico de ADN GeneAmp PCR System 9600 (fabricado por PERKIN ELMER). De igual modo, se añadieron
30 20 ng del plásmido pKM2160L6 obtenido en 1(3) del Ejemplo de Referencia 2 a un tampón que contiene 50 µl del tampón de PCR N 1 unido a polimerasa

KOD DNA (fabricada por TOYOBO), dNTP 0,2 mM, cloruro de magnesio 1 mM y ADN sintético 0,5 μ M que contiene las secuencias de nucleótidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 67 y 68, y se desarrolló la PCR del mismo modo descrito anteriormente. La solución de reacción (10 μ l) se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, y a continuación se recuperaron como productos de la PCR una región V de la cadena H de aproximadamente 0,46 kb y una región V de la cadena L de aproximadamente 0,43 kb, usando el kit *QIAquick Gel Extraction* (fabricado por QIAGEN).

10 A continuación, se añadieron 0,1 μ g del ADN obtenido por digestión de un plásmido pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene) con una enzima de restricción *Sma*I (fabricada por Takara Shuzo) y aproximadamente 0,1 μ g de cada uno de los productos de la PCR obtenidos anteriormente en agua estéril para obtener un volumen final de 7,5 μ l, y se añadieron 7,5 μ l de la solución

15 I del kit TAKARA DNA Ligation Ver. 2 (fabricado por Takara Shuzo) y 0,3 μ l de una enzima de restricción *Sma*I a la mezcla, que se dejó reaccionar a 22°C toda la noche. Usando el ADN recombinante resultante se transformó el ADN de la solución del plásmido, *E. coli* DH5 α (fabricado por TOYOBO). Cada ADN del plásmido se preparó a partir de los clones transformantes y se

20 sometió a la reacción usando un kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction* (fabricado por PE Biosystems) según las instrucciones del fabricante, y la secuencia de nucleótidos se analizó mediante un secuenciador de ADN ABI PRISM 377 del mismo fabricante. Por tanto, se obtuvieron los plásmidos pKM2160VH41 y pKM2160VL61 que se muestran

25 en la Figura 15, que tienen las secuencias de nucleótidos buscadas.

A continuación, se añadieron 3 μ g del vector de expresión del anticuerpo humanizado pKANTEK93 y 3 μ g del pKM2160VH41 obtenido anteriormente a un tampón que contiene 30 μ l de Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, cloruro de magnesio 10 mM y DTT 1 mM y 10 unidades de una enzima de

30 restricción *Apa*I (fabricada por Takara Shuzo) y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se sometió a una

precipitación con etanol y el precipitado resultante se añadió a un tampón que contiene 10 µl de Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, cloruro sódico 100 mM, cloruro magnésico 10 mM, DTT 1 mM, 100 µg/ml de BSA y Triton x-100 al 0,01%, añadiendo a todo ello 10 unidades de una enzima de restricción *NofI* (fabricada por Takara Shuzo), y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperaron fragmentos *Apal-NofI* de pKANTEX93 y pKM2160VH41 de aproximadamente 12,75 kb y de aproximadamente 0,44 kb, respectivamente. Los dos fragmentos así obtenidos se ligaron usando el kit TAKARA DNA Ligation Ver. 2 según las instrucciones del fabricante, y la *E. coli* DH5α (fabricada por TOYOBO) se transformó usando la solución del ADN del plásmido recombinante resultante. Cada ADN del plásmido se preparó a partir de los clones transformantes y se confirmó mediante el tratamiento con una enzima de restricción para obtener así el plásmido pKANTEX2160H que se muestra en la Figura 16, en el que se había insertado el fragmento *Apal-NofI* deseado de aproximadamente 0,44 kb.

A continuación, se añadieron 3 µg del plásmido pKANTEX2160H y 3 µg del plásmido pKM2160VL61 obtenidos anteriormente a un tampón que contiene Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, cloruro sódico 100 mM, cloruro magnésico 10 mM, DTT 1 mM y 100 µg/ml de BSA, la solución se ajustó para obtener un volumen total de 30 µl, añadiéndose a todo ello 10 unidades de una enzima de restricción *BsWI* (fabricada por New England Biolabs), y la mezcla se dejó reaccionar a 55°C durante 1 hora. A continuación se añadió una enzima de restricción *EcoRI* (fabricada por Takara Shuzo) y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se recuperaron los fragmentos *EcoRI-BsWI* de pKANTEX2160H y pKM2160VL61, de aproximadamente 13,20 kb y aproximadamente 0,41 kb, respectivamente. Los dos fragmentos así obtenidos se ligaron usando el kit *TAKARA DNA Ligation Ver. 2* según las instrucciones del fabricante, y la *E. coli* DH5x (fabricada por TOYOBO) se transformó usando la solución de ADN del plásmido recombinante resultante.

Cada ADN del plásmido se preparó a partir de los clones transformantes y se confirmó mediante tratamiento con una enzima de restricción para obtener así el plásmido pKANTEX2160 que se muestra en la Figura 17, en la que se había insertado el fragmento *EcoRI-BsWI* deseado de aproximadamente 0,41 kb. Cuando el plásmido se sometió a la reacción usando el kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction* (fabricado por PE Biosystems) según las instrucciones del fabricante, y se analizó la secuencia de nucleótidos mediante un secuenciador de ADN ABI PRISM 377 del mismo fabricante, se confirmó que se había obtenido el plásmido deseado en el que se había clonado el ADNc que codifica las regiones V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo KM2160.

(2) Expresión estable del anticuerpo quimérico anti-CCR4 usando una célula animal

El anticuerpo quimérico anti-CCR4 se expresó en células animales tal como se describe a continuación, usando el vector de expresión pKANTEX2160 del anticuerpo quimérico anti-CCR4 obtenido en 2(1) del Ejemplo de Referencia 2.

El plásmido pKANTEX2160 se convirtió en una forma lineal mediante digestión con una enzima de restricción *AatII* (fabricada por TOYOBO) y se introdujeron 10 µg del mismo en 4×10^6 células de la línea de células de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL1662) por electroporación (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), y las células se suspendieron en 40 ml de medio H-SFM (fabricado por GIBCO-BRL) (suplementado con FCS al 5%) y se dispensaron en alícuotas de 200 µl/pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite). Veinticuatro horas después de la incubación a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5%, se añadió G418 para obtener una concentración de 1 mg/ml, seguido por el cultivo durante 1 a 2 semanas. Se recuperó un sobrenadante del cultivo a partir de un pocillo en el que apareció una colonia de transformante resistente a G418 y se hizo confluyente, y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo quimérico anti-

CCR4 en el sobrenadante se midió mediante ELISA como se muestra en 2(3) del Ejemplo de Referencia 2 (como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo de cabra anti-IgG (γ) humana marcado con peroxidasa).

Para aumentar la cantidad expresada del anticuerpo usando el sistema de amplificación del gen dhfr, el transformante de un pocillo en el que se encontró la expresión del anticuerpo quimérico anti-CCR4 en el sobrenadante del cultivo se suspendió para obtener una densidad de 1 a 2×10^5 células/ml en medio H-SFM que contiene 1 mg/ml de G418 y metotrexato 50 nM (denominado en lo sucesivo "MTX": fabricado por Sigma) que es el inhibidor de la dihidrofolato reductasa del producto del gen dhfr, y la suspensión se dispuso en alícuotas de 1 μ l en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). La mezcla se cultivó a 37°C durante 1 a 2 semanas en una incubadora de CO₂ al 5%, de forma que se indujo un transformante que muestra resistencia a MTX 50 nM. Cuando el transformante se hizo confluyente en un pocillo se midió la actividad de unión al antígeno del anticuerpo quimérico anti-CCR4 en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA como se muestra en 2(3) del Ejemplo de Referencia 2. Con respecto a los transformantes en pocillos en los que se encontró la expresión del anticuerpo quimérico anti-CCR4 en el sobrenadante de los cultivos, la concentración de MTX aumentó a 100 nM y a continuación a 200 nM de la misma forma, para obtener finalmente un transformante que puede crecer en el medio H-SFM que contiene 1 mg/ml de G418 y 200 nM de MTX y también puede expresar en gran cantidad el anticuerpo quimérico anti-CCR4. El transformante así obtenido se sometió a un aislamiento de una sola célula (clonación) mediante dos veces el análisis de dilución limitada, y un clon transformante que tiene la expresión más alta del anticuerpo quimérico anti-CCR4 recibió el nombre de KM2760. La cantidad expresada del anticuerpo quimérico anti-CCR4 mediante KM2760 fue aproximadamente de 5 μ g/ 10^8 células/24 horas. Además, la región C de la cadena H del anticuerpo KM2760 pertenece a una subclase de IgG1 humana. El anticuerpo KM2760 se ha depositado internacionalmente como FERM BP-7054 el 24 de febrero

de 2000, en el *National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry* (nombre actual: *International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*) (Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki Prefecture, Japón (dirección actual: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón)).

Ejemplo de Referencia 3

10 Establecimiento de células de expresión elevada de hCCR4:

(1) Construcción del vector de expresión CAG-pc ADNc3 para una célula animal

15 Se construyó un vector de expresión como se ha descrito a continuación mediante la producción de un vector de expresión (CAG-pc ADNc3) en el que la región promotora de un vector de expresión para una célula animal, pc ADNc3 (fabricado por INVITROGEN), se cambió desde el promotor de citomegalovirus (CMV) a un CAG (promotor AG (actina β de pollo modificada) con potenciador CMV-IE), e insertando el gen CCR4 en el
20 vector.

El pcADNc3 (5 μ g) se dejó reaccionar con una enzima de restricción *NruI* (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora, y a continuación se recuperaron los fragmentos de ADN mediante precipitación con etanol. A continuación, se dejaron reaccionar con una enzima de restricción *HindIII*
25 (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora y a continuación se fraccionaron mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar un fragmento de ADN de aproximadamente 5,8 kb que no contenía la región promotora del CMV. El plásmido CAG-pBluescript IKS(+) (3 μ g) que tiene la región promotora CAG (*Nuc. Acid. Res.*, 23, 3816 (1995)) se dejó reaccionar
30 con una enzima de restricción *SaII* (fabricada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora y a continuación se recuperaron los fragmentos de ADN

mediante precipitación con etanol. Se eliminaron los extremos con el kit DNA Blunting (fabricado por Takara Shuzo), y después se dejaron reaccionar con *HindIII* a 37°C durante 1 hora, y a continuación se fraccionaron mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kb que contiene la región promotora CAG. Los fragmentos respectivos de ADN recuperados de esta manera se ligaron usando el kit *DNA Ligation* (fabricado por Takara Shuzo), y la *E. coli* DH5α se transformó usando el plásmido de ADN recombinante resultante para obtener el plásmido CAG-pc ADNc3.

10

(2) Construcción del vector de expresión hCCR4

Se construyó un vector de expresión hCCR4 como se describe a continuación usando el gen CAG-pc ADNc3 obtenido en el apartado 3(1) del Ejemplo de Referencia 2 y el gen pc ADNc3 insertado en el ADN del hCCR4 (CCR4/pC ADNc3). Ambos genes CAG-pc ADNc3 y CCR4/pC ADNc3 se dejaron reaccionar con *HindIII* a 37°C durante 1 hora y los fragmentos de ADN se recuperaron mediante precipitación con etanol. A continuación, se dejaron reaccionar con *BglII* (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora y a continuación se fraccionaron mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar un fragmento de ADN de aproximadamente 2,0 kb que contiene la región promotora CAG y un fragmento de ADN de aproximadamente 5,5 kb que contiene la región del gen hCCR4. A continuación se obtuvo el plásmido CAG-CCR4/pC ADNc3 usando ambos fragmentos de ADN de la misma forma que en el apartado 3(1) del Ejemplo de

25

Referencia 2.

(3) Expresión de hCCR4 en una célula animal

El plásmido se introdujo en células animales por electroporación en la misma manera descrita en 2(2) del Ejemplo de Referencia 2. Las células EL-

30

4 (ATCC TIB-39) se suspendieron en PBS(-) (fabricado por GIBCO-BRL) para obtener una densidad de 1×10^7 células/500 μ l, se añadieron 10 μ g del CAG-CCR4/pc ADNc3 obtenido en 3(2) del Ejemplo de Referencia 2, y la mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos y a continuación se puso en una cubeta para uso exclusivo (fabricada por Bio-Rad) para realizar la introducción del gen a 280 V y 500 μ FD. Después la mezcla se incubó de nuevo en hielo durante 10 minutos, las células se suspendieron en 200 ml de medio FCS-RPMI al 10% y se dispensaron en alícuotas de 200 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos para el cultivo celular. Veinticuatro horas después del cultivo se extrajeron 100 μ l del sobrenadante del cultivo de cada pocillo y se dispuso medio FCS-RPMI al 10% que contenía 1 mg/ml de G418 en alícuotas de 100 μ l/pocillo para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml. Dos semanas después se seleccionaron y cultivaron de nuevo los clones aislados entre 10 y 100.

15

(4) Selección de células con expresión elevada de hCCR4

Se seleccionaron por un método inmunofluorescente usando el anticuerpo KM2160 preparado en (5) del Ejemplo de Referencia 1. En una placa de 96 pocillos con fondo en U se dispensaron 2×10^5 células de cada una de las varias decenas de clones introducidos en el gen. El anticuerpo KM2160 marcado con biotina mediante un método conocido (*Enzyme Antibody Method*, publicado por Gakusai Kikaku) en una concentración se diluyó hasta 5 μ g/ml con un tampón para FACS (BSA-PBS al 1%, EDTA al 0,02%, NaN_3 al 0,05%, pH 7,4), la IgG humana (fabricada por Welfide) se diluyó hasta 3,75 mg/ml para prevenir la tinción inespecífica y se dispuso cada una de las soluciones del anticuerpo así diluidas en alícuotas de 200 μ l/pocillo, y la mezcla se dejó reaccionar en hielo durante 30 minutos.

Como control negativo se usó un anticuerpo anti-IL-5R biotinilado (WO 97/10354) con la misma concentración. Después de lavar dos veces con 200 μ l/pocillo del tampón se dispensaron alícuotas de 20 μ l/pocillo de estreptoavidina-PE (fabricado por Becton Dickinson Japón). Treinta minutos

30

después de la reacción en hielo en la oscuridad se lavaron las células tres veces con 200 µl/pocillo y finalmente se suspendieron hasta 500 µl, y se midió la intensidad de fluorescencia con un citómetro de flujo para seleccionar una línea celular que tuviera la intensidad de fluorescencia más alta. La línea celular que tenía la intensidad de fluorescencia más alta se usó como CCR4/EL-4.

Si bien la invención se ha descrito con detalle y con referencia a realizaciones específicas de los mismos, será evidente para una persona experta en la materia que se pueden hacer varios cambios y modificaciones en ella sin apartarse del espíritu y ámbito de la misma. Todas las referencias que se citan en este documento se incorporan en su totalidad.

Esta solicitud se basa en la solicitud japonesa N° 2001-285144 depositada el 31 de agosto de 2001, cuyo contenido completo se incorpora en este documento como referencia.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Tal como se ha comentado anteriormente, según la presente invención se proporciona un anticuerpo recombinante y un fragmento de dicho anticuerpo que se unen específicamente una CCR4 y que contiene una nueva CDR frente a CCR4. El anticuerpo de la presente invención es útil para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades relacionadas con CCR4. Específicamente, es útil para la detección inmunológica de una célula Th2 humana mediante la tinción celular inmune y para el diagnóstico o tratamiento de todas las enfermedades inmunes mediadas por Th2 incluida el asma bronquial y la enfermedad atópica cutánea, las enfermedades en las que los estados morbosos avanzan debido a un equilibrio anormal de las células Th2 y los cánceres, incluidos los cánceres hematológicos como la leucemia.

TEXTO LIBRE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

N° de ID de la SEC.: 4 - Explicación de la secuencia artificial: Péptido

- sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 8 - Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético**
- 5 Nº de ID de la SEC.: 9 - Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 10-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 11-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético**
- 10 Nº de ID de la SEC.: 12-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 13-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 14-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético**
- 15 Nº de ID de la SEC.: 16-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 17-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 18-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 19-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- 20 Nº de ID de la SEC.: 20-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 21-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 22-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 23-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 24-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- 25 Nº de ID de la SEC.: 26-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 27-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 28-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 29-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 30-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- 30 Nº de ID de la SEC.: 31-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**
- Nº de ID de la SEC.: 32-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético**

- Nº de ID de la SEC.: 33-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 34-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 35-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 38-Explicación de la secuencia artificial: Péptido
5 sintético
- Nº de ID de la SEC.: 39-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- Nº de ID de la SEC.: 40-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- 10 Nº de ID de la SEC.: 41-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- Nº de ID de la SEC.:42-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 43-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 44-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- 15 Nº de ID de la SEC.: 45-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 46-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 47-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 49-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 50-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- 20 Nº de ID de la SEC.: 51-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 52-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 53-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 54-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 55-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- 25 Nº de ID de la SEC.: 56-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 57-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 58-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 59-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 60-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- 30 Nº de ID de la SEC.: 65-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 66-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

108
105

- Nº de ID de la SEC.: 67-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 68-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 69-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
- Nº de ID de la SEC.: 70-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- 5
- Nº de ID de la SEC.: 71-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- Nº de ID de la SEC.: 72-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- 10
- Nº de ID de la SEC.: 73-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- Nº de ID de la SEC.:74- Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- Nº de ID de la SEC.: 75-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- 15
- Nº de ID de la SEC.: 76-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- Nº de ID de la SEC.: 77-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
- 20
- Nº de ID de la SEC.: 78-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con una región extracelular del receptor 4 de la quimiocina CC humana (CCR4) pero que no reacciona con una plaqueta humana, o el
5 fragmento de dicho anticuerpo.
2. Un anticuerpo humano injertado en una CDR que reacciona específicamente con una región extracelular del receptor 4 de la quimiocina CC humana (CCR4) y que tiene una actividad citotóxica frente a una célula que expresa CCR4, o el fragmento de dicho anticuerpo
- 10 3. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según la reivindicación 1, que tiene una actividad citotóxica frente a una célula que expresa CCR4.
4. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual la
15 región extracelular es una región extracelular seleccionada entre el grupo formado por las posiciones 1 a 39, 98 a 112, 176 a 206 y 271 a 284 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48.
5. El anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la región
20 extracelular es un epítipo presente en las posiciones 2 a 29 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48.
- 6 El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual la
25 región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 13 a 29 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48.
7. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual la
región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 13 a 25 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 48.
- 30 8. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que

reacciona específicamente con una célula que expresa CCR4.

9. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que tiene una actividad citotóxica mayor frente a una célula que expresa CCR4 que un anticuerpo monoclonal producido por hibridoma de un animal no humano.

10. El anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el cual la actividad citotóxica es una actividad citotóxica mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC).

11. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según la reivindicación 10, en el cual la actividad ADCC es una actividad de inducción de apoptosis de una célula que expresa CCR4.

12. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que tiene una actividad de depleción de una célula que expresa CCR4.

13. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el cual la célula que expresa CCR4 es una célula Th2.

14. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que tiene una actividad de inhibición de la producción de citocinas de una célula Th2.

15. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según la reivindicación 14, en el cual la citocina es IL-4, IL-5 o IL-13.

16. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que pertenece a un anticuerpo IgG humano.

17. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) y una región V

108

de una cadena ligera (cadena L) de un anticuerpo monoclonal frente a CCR4.

18. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una
5 región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) y una región V de una cadena ligera (cadena L) de un anticuerpo monoclonal frente a CCR4, y estructuras rígidas (FR) de la región V de la cadena H y de la región V de la cadena L de un anticuerpo humano.

19. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de
10 dicho anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que contiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) y la región V de una cadena ligera (cadena L) de un anticuerpo monoclonal frente a CCR4, estructuras rígidas (FR) de la región V de la cadena H y de la región V de la
15 cadena L de un anticuerpo humano, y la región constante (región C) de la cadena H y la región C de la cadena L de un anticuerpo humano.

20. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que contiene la región determinante de la complementariedad (CDR)1, CDR2 y
20 CDR3 de una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 1, 2 y 3, respectivamente.

21. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, que
25 comprende la región determinante de la complementariedad (CDR)1, CDR2 y CDR3 de una región variable (región V) de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 5, 6 y 7, respectivamente.

22. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de
30 dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR)1, CDR2 y

CDR3 de una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 1, 2 y 3, respectivamente, y la región determinante de la complementariedad (CDR)1, CDR2 y CDR3 de una región V de una
5 cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por los N° de ID de las SEC.: 5, 6 y 7, respectivamente.

23. El anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que
10 contiene una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ala en la posición 40, Gly en la posición 42, Lys en la posición 43, Gly en la posición 44, Lys en la posición 76 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos
15 representada por el N° de ID de la SEC.: 4 se sustituye por otro aminoácido.

24. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos en la que al
20 menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Thr en la posición 28 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 38 se sustituye por otro aminoácido.

25. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, que
25 comprende una región variable (región V) de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8 se sustituye por
30 otro aminoácido.

26. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de

dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 y 25, que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ala en la posición 40, Gly en la posición 42, Lys en la posición 43, Gly en la posición 44, Lys en la posición 76 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 4 se sustituye por otro residuo de aminoácido; y una región V de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8 se sustituye por otro residuo de aminoácido.

27. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, 24 y 25, que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Thr en la posición 28 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 38 se sustituye por otro residuo de aminoácido; y una región V de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8 se sustituye por otro residuo de aminoácido.

28. El anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 y 25, que contiene una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 4, 9, 10, 11, 38, 39, 40 o 41.

29. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 y 28, que comprende una región variable (región V) de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8, 12, 13 ó 14.

30. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que contiene una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 4, 9, 10, 11, 38, 39, 40 ó 41; y una región V de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 8, 12, 13 ó 14.

31. El anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que comprende una región variable (región V) de una cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 9 ó 10; y una región V de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos representada por el N° de ID de la SEC.: 14.

32. El fragmento del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en el cual el fragmento del anticuerpo es un fragmento del anticuerpo seleccionado entre Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un fragmento dimerizado (Diabody) de la región variable (región V), un fragmento estabilizado con disulfuro de la región V (dsFv) y un péptido que contiene una región determinante de la complementariedad (CDR).

33. Un anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, que es producido por un transformante KM8759 (FERM BP-8129) o KM8760 (FERM BP-8130).

34. Un transformante que produce el anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 33.

35. El transformante según la reivindicación 34, en el cual el transformante es KM8759 (FERM BP-8129) o KM8760 (FERM BP-8130).

36. Un proceso para la producción de un transformante capaz de producir el anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, que comprende el cultivo del transformante según la reivindicación 34 o 35 en un medio para formar y acumular el anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo en el cultivo; y la recuperación del anticuerpo o el fragmento del anticuerpo del cultivo.

37. Un anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 se conjuga químicamente o genéticamente con un radioisótopo, una proteína o un fármaco.

38. Un ADN que codifica el anticuerpo humano injertado en una CDR, o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33.

39. Un vector recombinante que comprende el ADN según la reivindicación 38.

40. Un transformante que se puede obtener por la introducción del vector recombinante según la reivindicación 39 en una célula huésped.

41. Un medicamento que comprende al menos un componente seleccionado entre el anticuerpo humano injertado en una CDR y el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y 37 como un principio activo.

42. Un producto terapéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con CCR4, que comprende al menos un componente seleccionado entre el anticuerpo humano injertado en una CDR y el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y 37 como un principio activo.

43. El producto terapéutico según la reivindicación 42, en el cual la enfermedad relacionada con CCR4 es un cáncer o enfermedades inflamatorias.
44. El producto terapéutico según la reivindicación 43, en el cual el
5 cáncer es un cáncer hematológico.
45. El producto terapéutico según la reivindicación 44, en el cual el cáncer hematológico es leucemia o linfomatosis.
46. El producto terapéutico según la reivindicación 43, en el cual la
10 enfermedad inflamatoria es una hipersensibilidad de las vías respiratorias o asma bronquial agudas o crónicas, enfermedad atópica cutánea, rinitis alérgica o polinosis.
47. Un producto para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con CCR4, que comprende al menos un componente seleccionado entre el anticuerpo humano injertado en una CDR y el fragmento de dicho anticuerpo
15 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y 37 como un principio activo.
48. El producto para diagnóstico según la reivindicación 47, en el cual la enfermedad relacionada con CCR4 es un cáncer o una enfermedad inflamatoria.
49. El producto para diagnóstico según la reivindicación 48, en el cual
20 el cáncer es un cáncer hematológico.
50. El producto para diagnóstico según la reivindicación 48, en el cual el cáncer hematológico es leucemia o linfomatosis.
51. El producto para diagnóstico según la reivindicación 48, en el cual
25 la enfermedad inflamatoria es asma crónica por hipersensibilidad de las vías respiratorias, asma bronquial, enfermedad atópica cutánea, rinitis alérgica o polinosis.
52. Un producto terapéutico para el tratamiento de enfermedades inmunes mediadas por Th2, que comprende al menos un componente seleccionado entre el anticuerpo humano injertado en una CDR y el
30 fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y 37 como un principio activo.

53. El producto terapéutico según la reivindicación 52, en el cual la enfermedad inmune mediada por Th2 es asma crónica por hipersensibilidad de las vías respiratorias, asma bronquial, enfermedad atópica cutánea, rinitis alérgica o polinosis.

5 54. Un producto para el diagnóstico de enfermedades inmunes mediadas por Th2, que comprende al menos un componente seleccionado entre el anticuerpo humano injertado en una CDR y el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y 37 como un principio activo.

10 55. El producto para diagnóstico según la reivindicación 54, en el cual la enfermedad inmune mediada por Th2 es asma crónica por hipersensibilidad de las vías respiratorias, asma bronquial, enfermedad atópica cutánea, rinitis alérgica o polinosis.

15 56. Un método la detección inmunológica de CCR4, que usa el anticuerpo humano injertado en una CDR y el fragmento de dicho anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y 37.

20 57. Un método la detección inmunológica de una célula que expresaba CCR4 en la superficie celular, que comprende el uso del anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y 37.

58. Un método para reducir o deplecionar una célula que expresaba CCR4 en la superficie celular, que consiste en el uso del anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y 37.

25 59. Un método para inhibir la producción de citocinas de una célula Th2, que comprende el uso del anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y 37.

RESUMEN

ANTICUERPO HUMANO INJERTADO EN UNA CDR Y

FRAGMENTO DE DICHO ANTICUERPO

5

Un anticuerpo humano injertado en una CDR o el fragmento de dicho anticuerpo, que reacciona específicamente con la región extracelular del receptor 4 de la quimiocina CC humana (CCR4) pero que no reacciona con una plaqueta humana; un anticuerpo humano injertado en una CDR o el

10 fragmento de dicho anticuerpo, que reacciona específicamente con la región extracelular de CCR4 y tiene una actividad citotóxica frente a una célula que expresa CCR4; y un medicamento, un producto terapéutico o un producto para diagnóstico que contiene al menos uno de los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo de los mismos como un principio activo.

15

FIG. 1

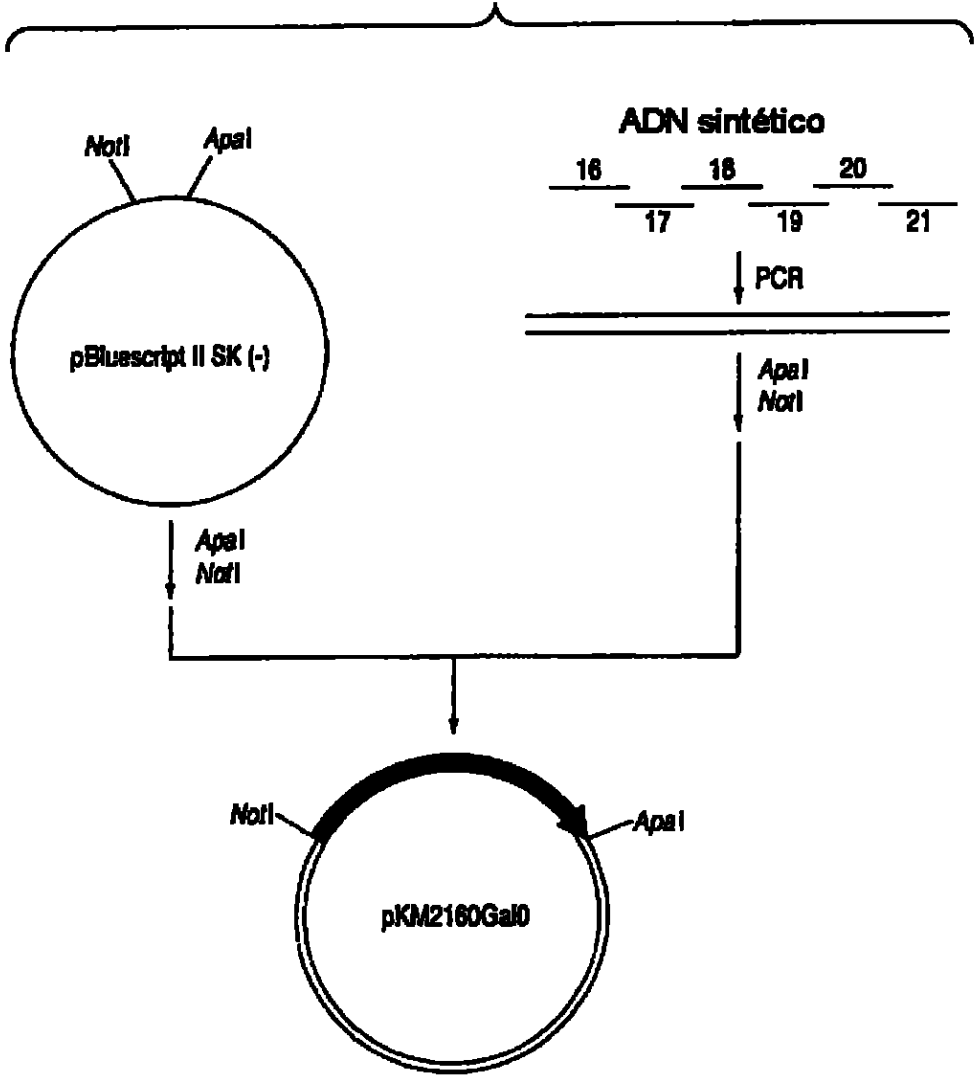


FIG. 2

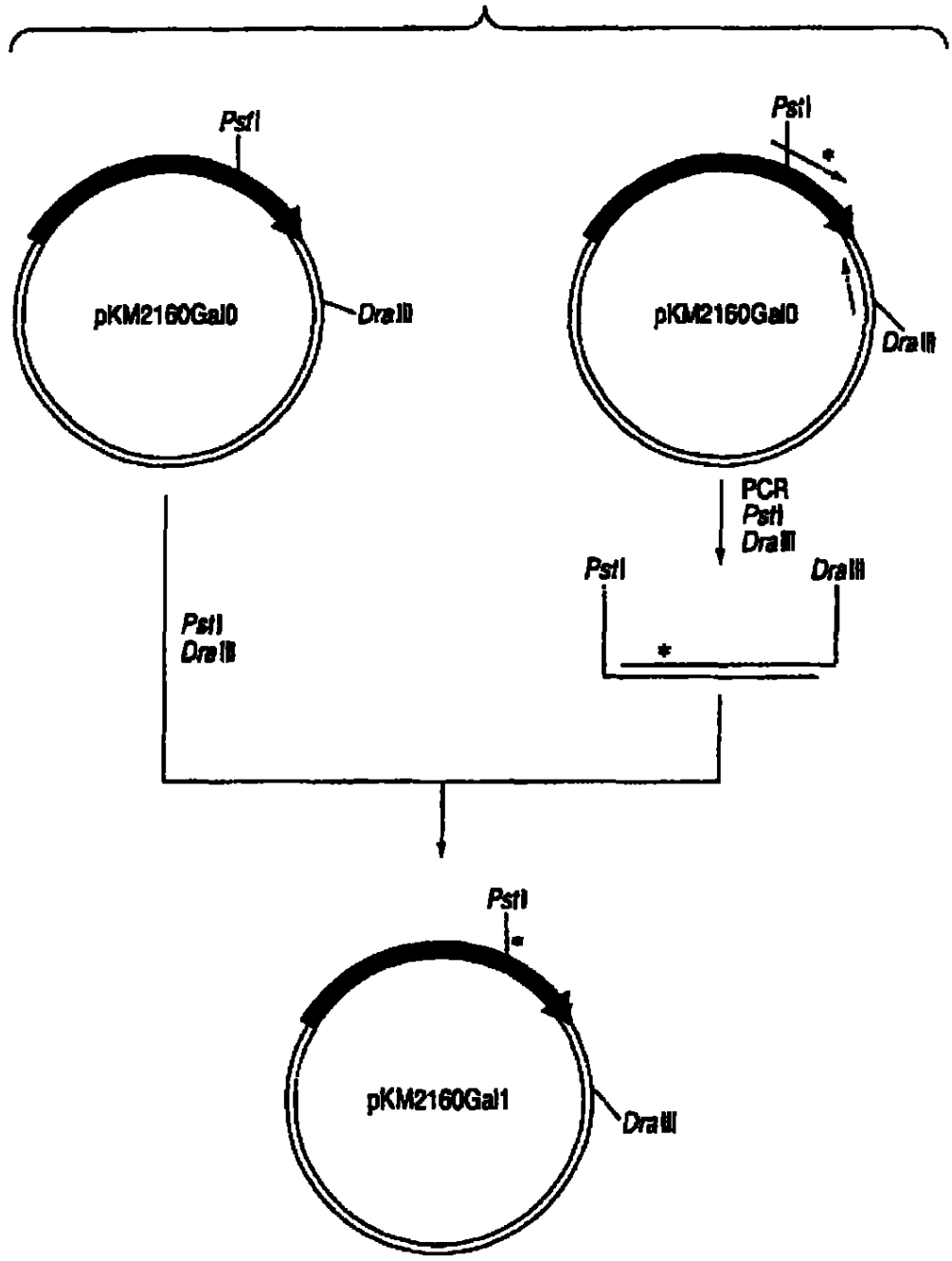
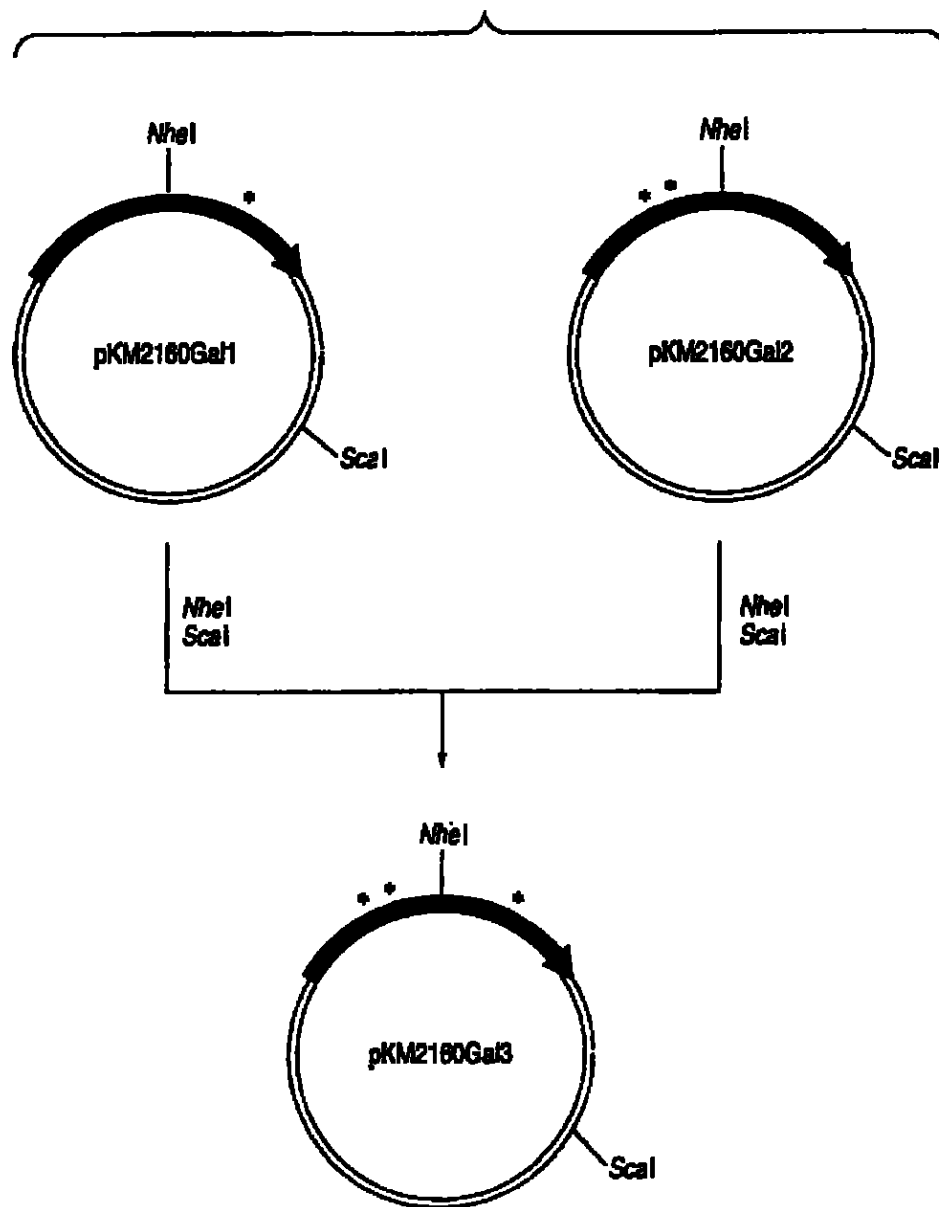


FIG. 3



+22
119

FIG. 4

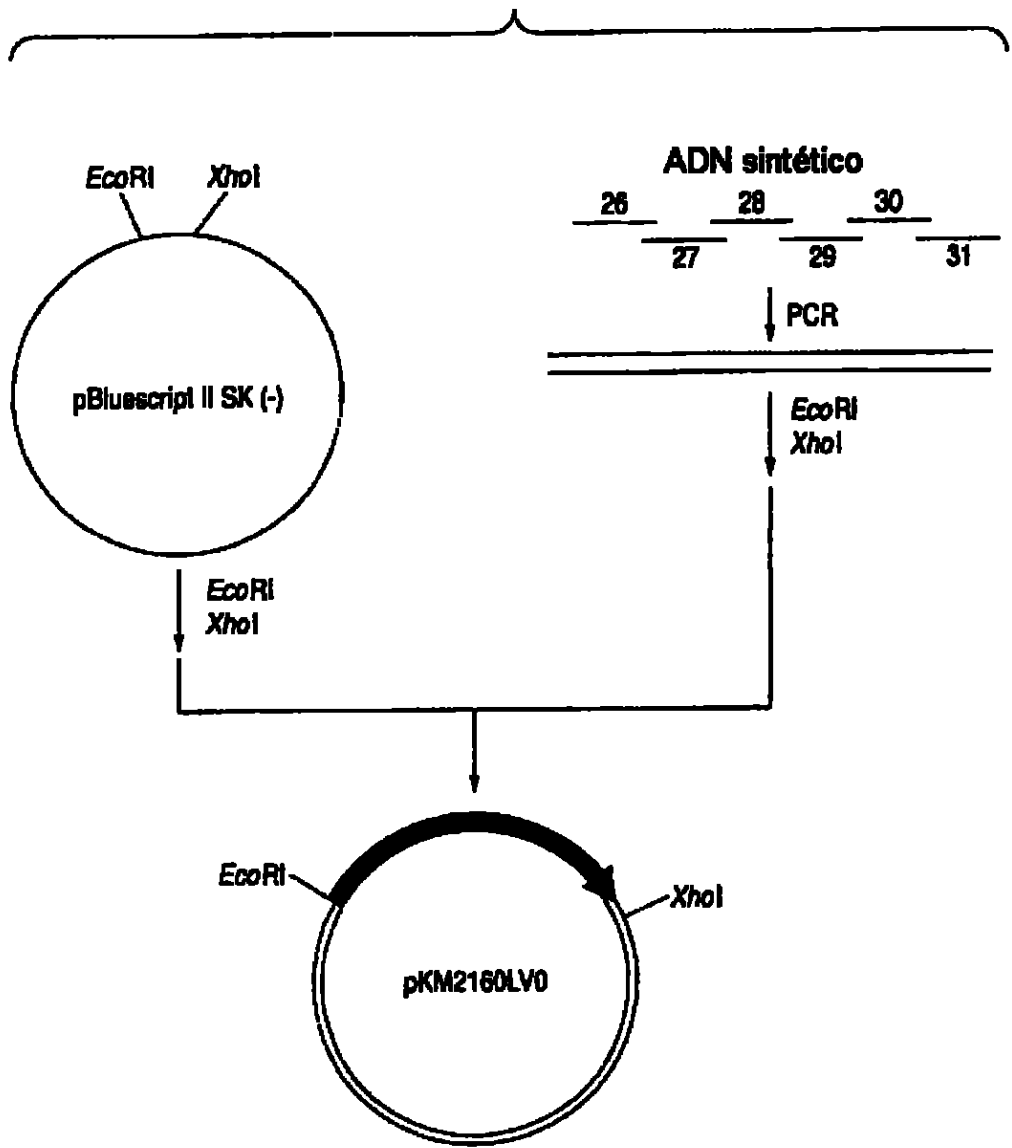


FIG. 5

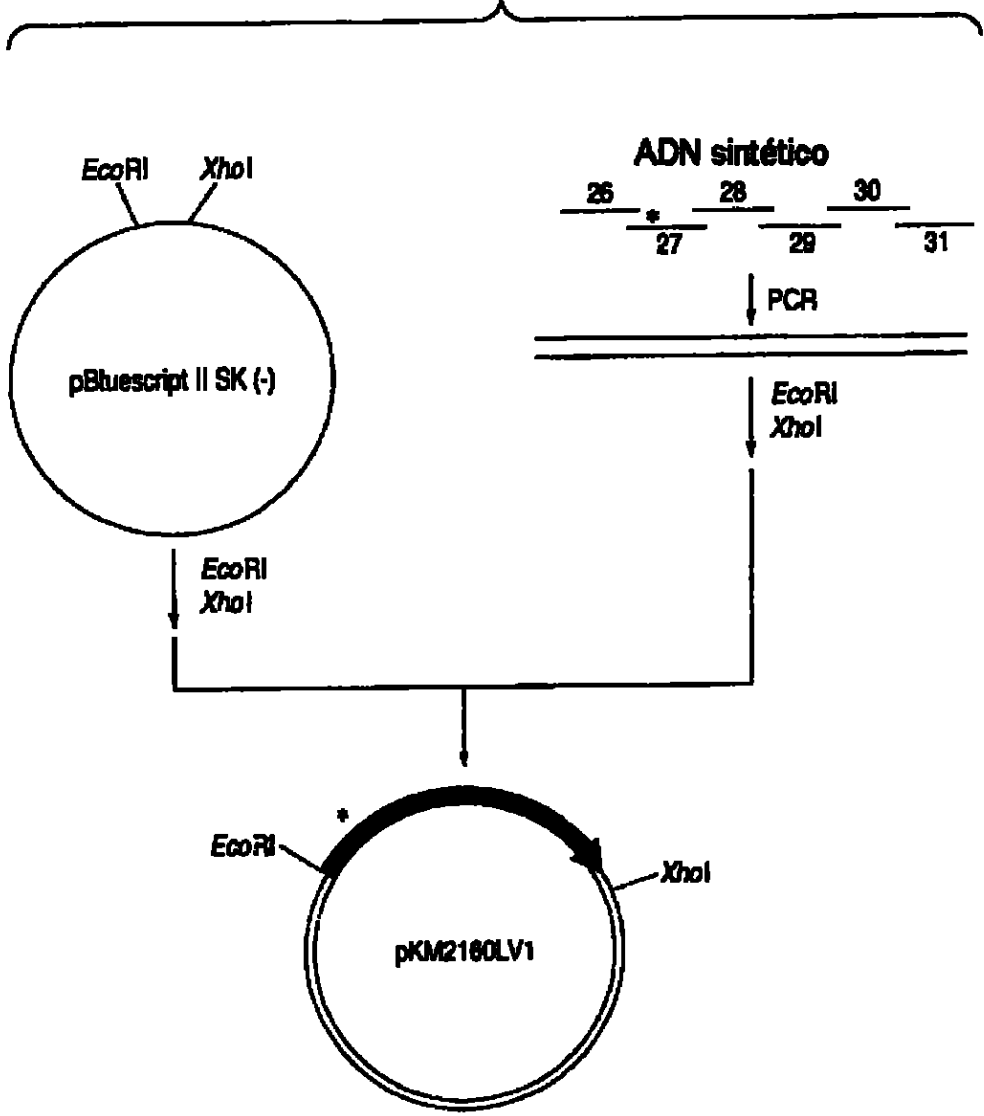


FIG. 6

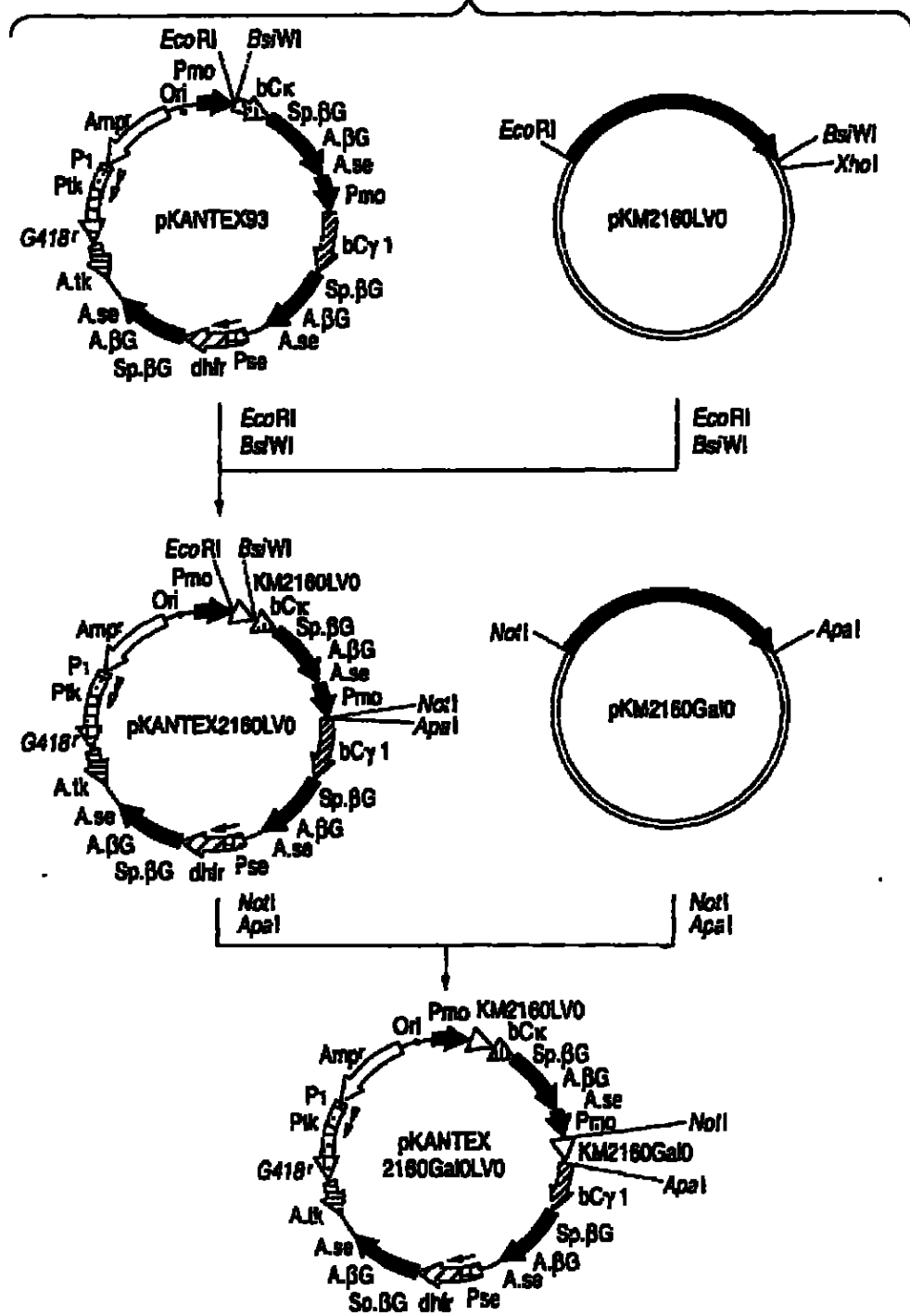
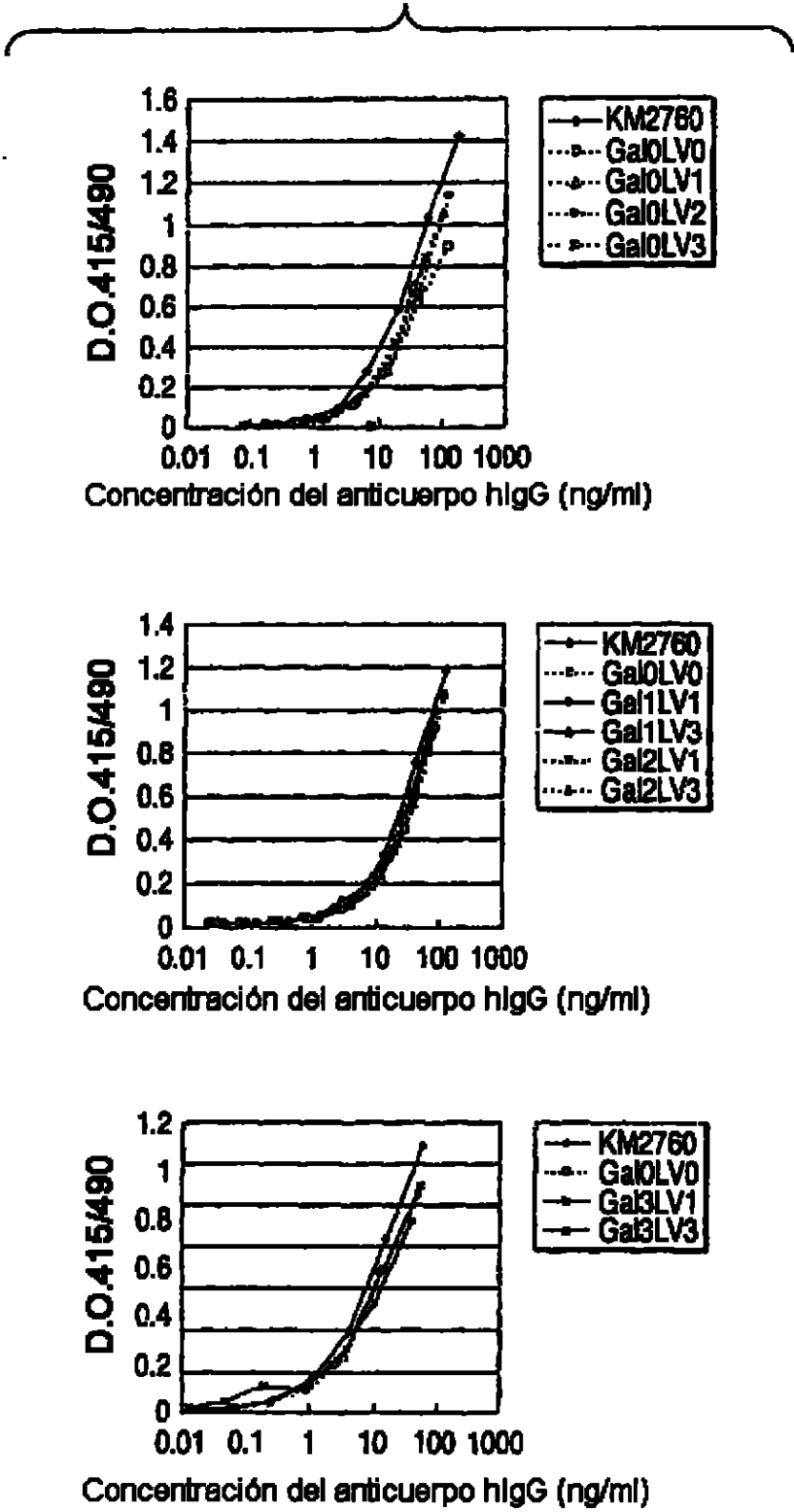


FIG. 7



125
123

FIG. 8

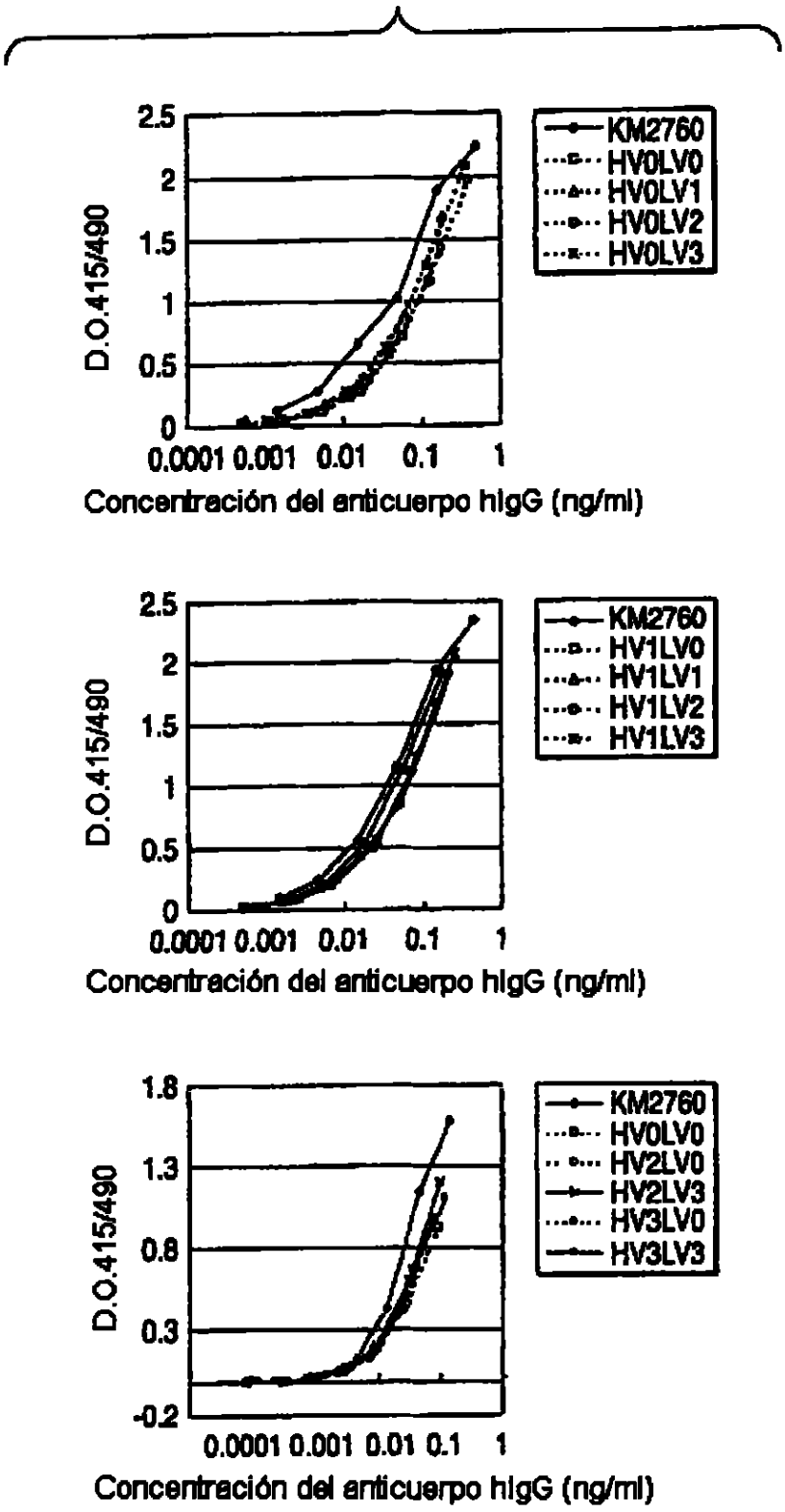


FIG. 9

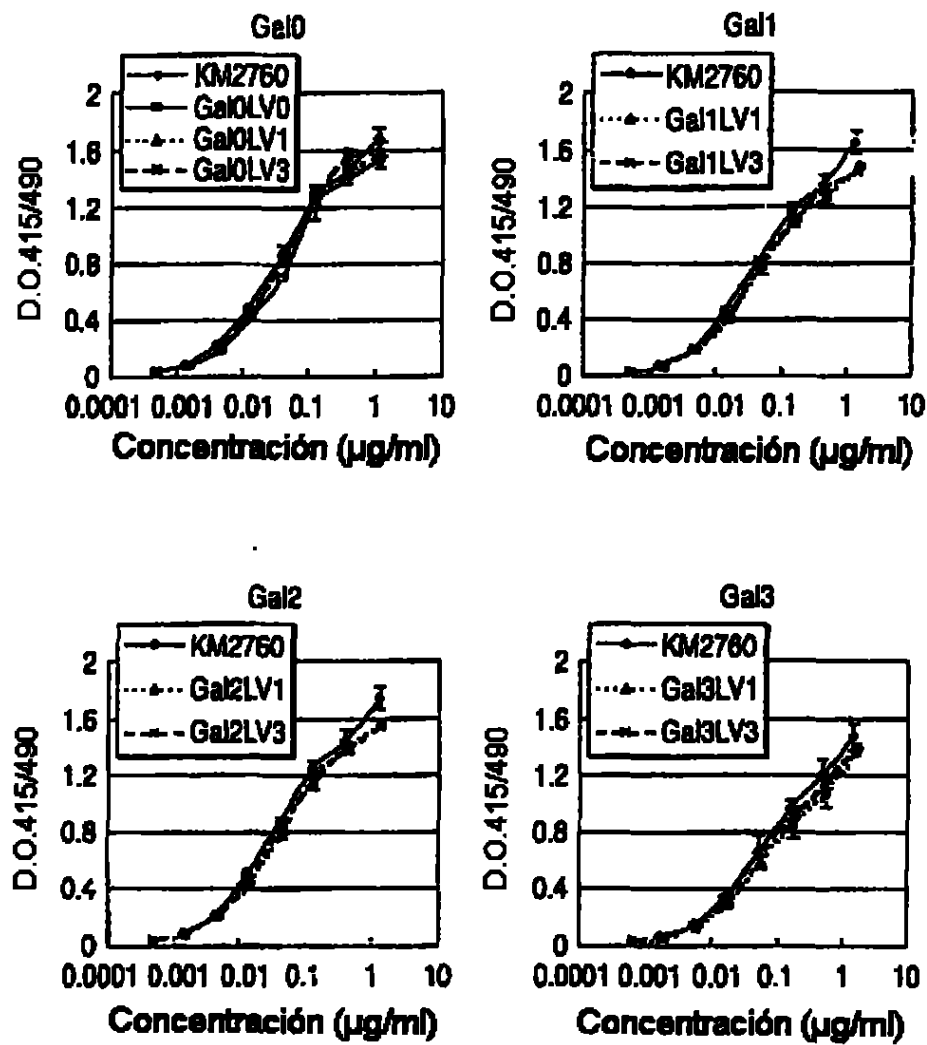


FIG. 10

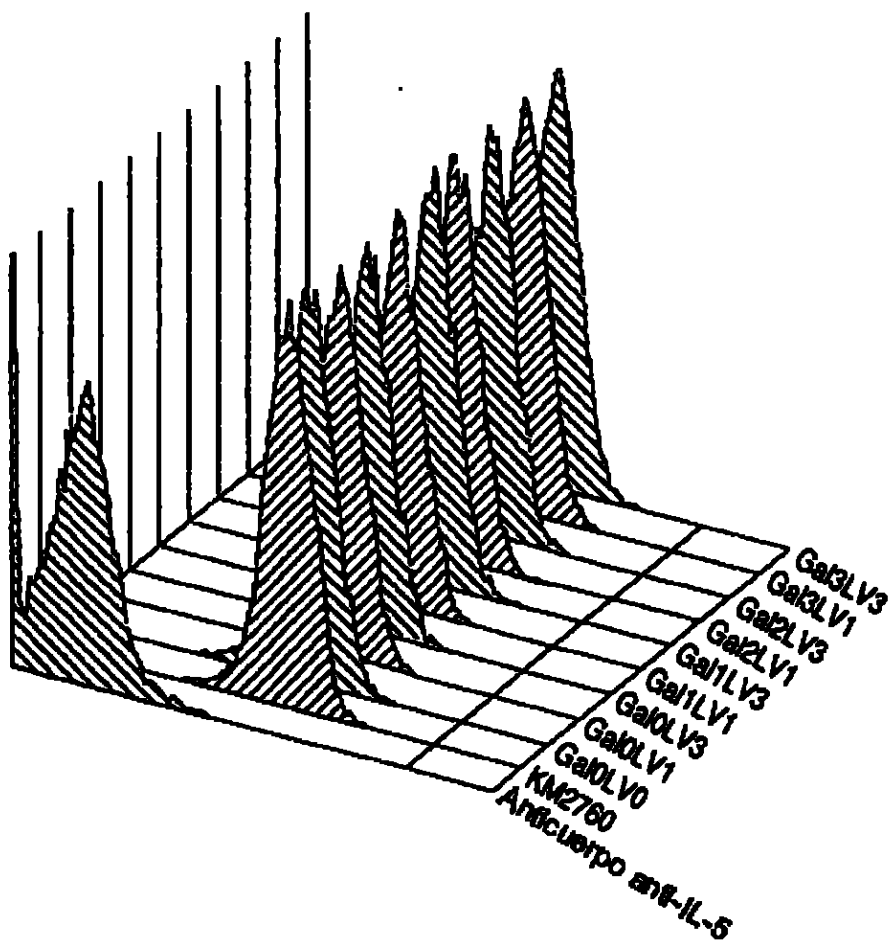


FIG. 11

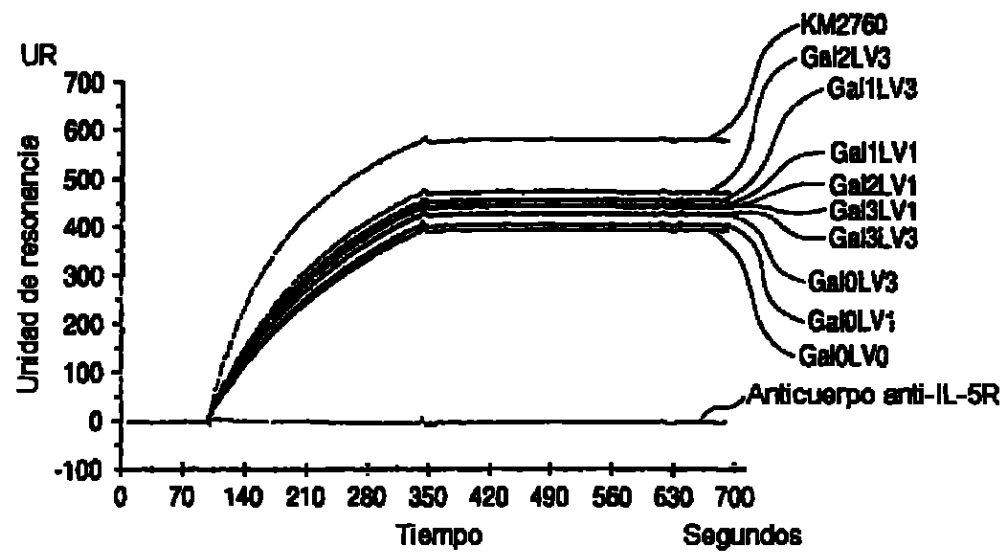
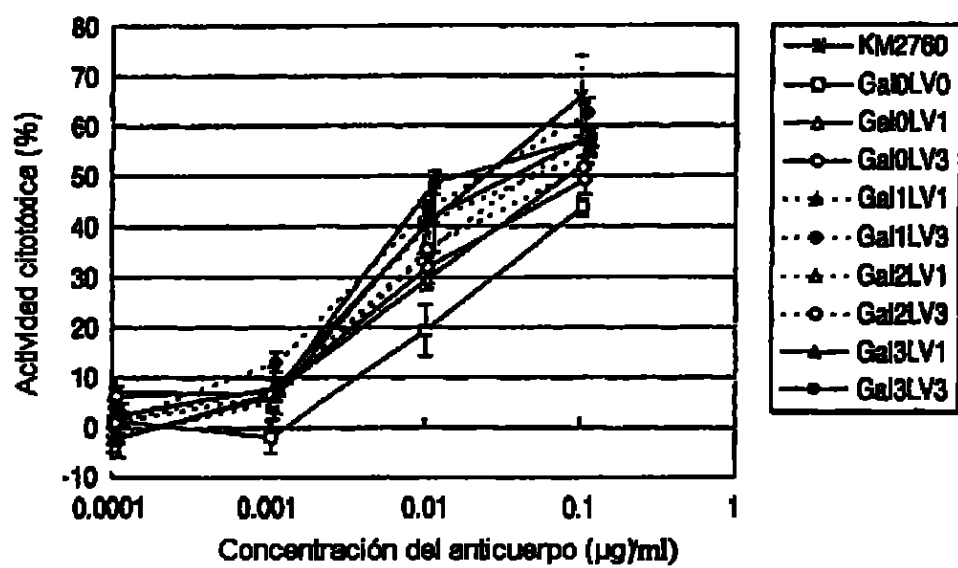


FIG. 12



131
128

FIG. 13

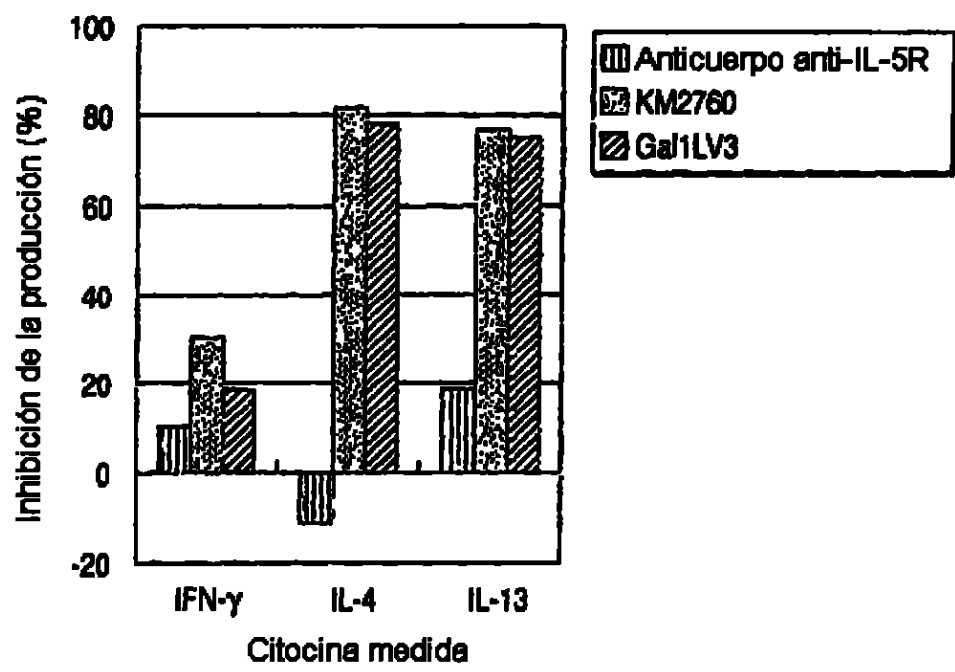


FIG. 14

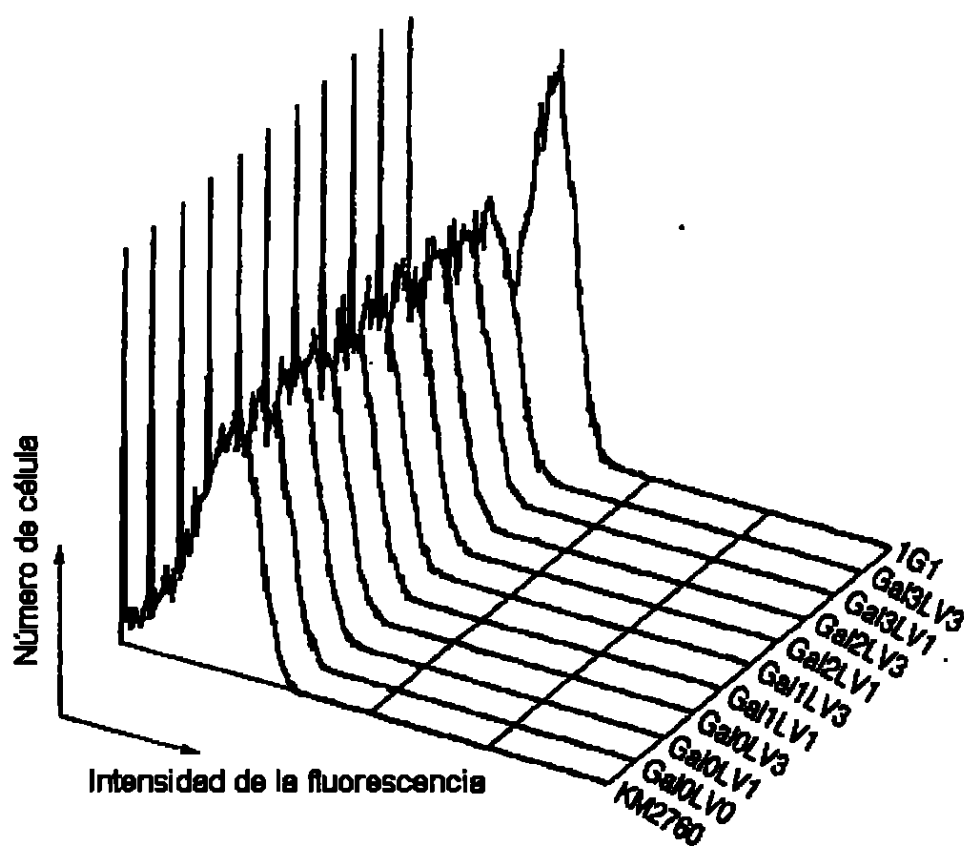
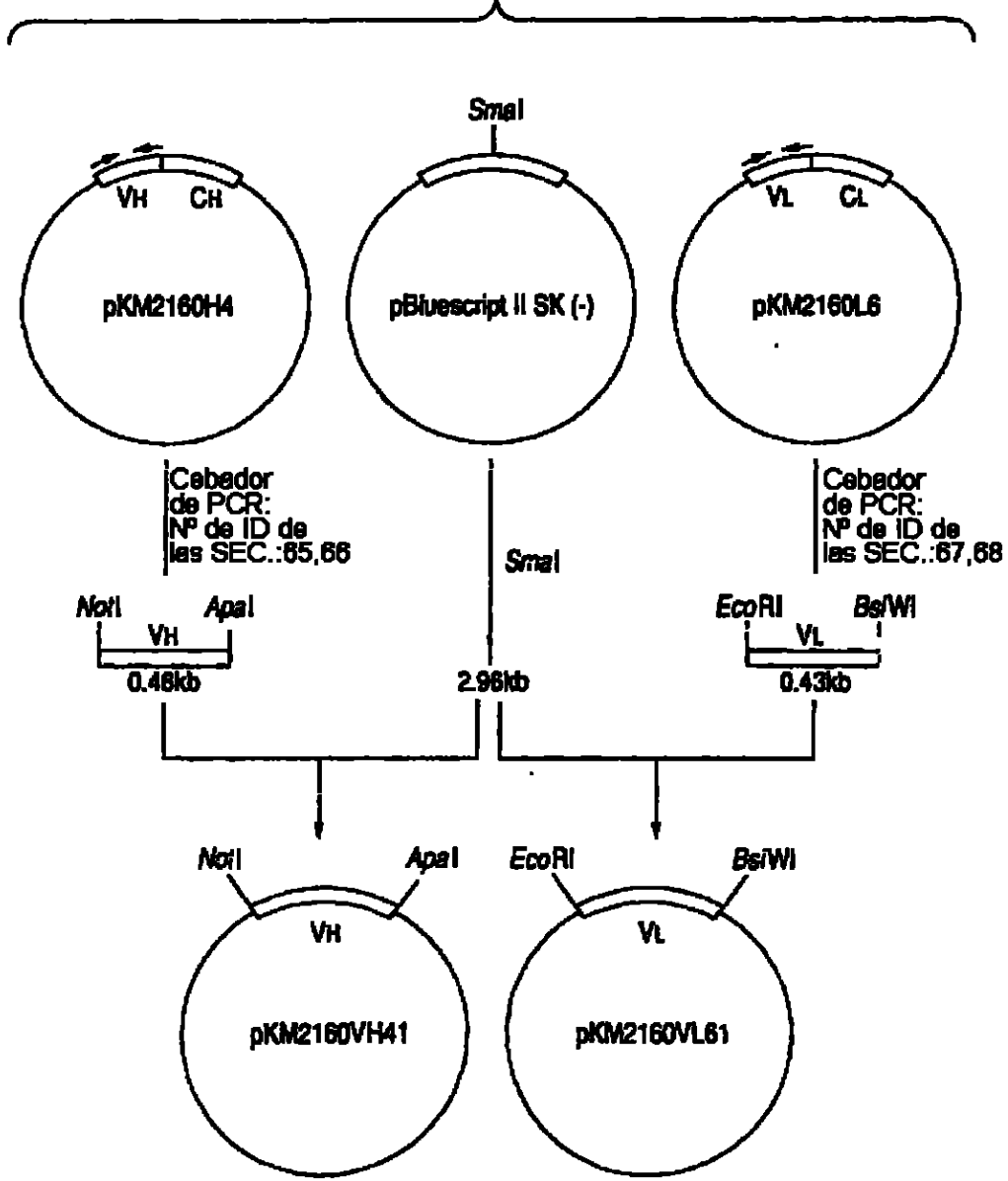
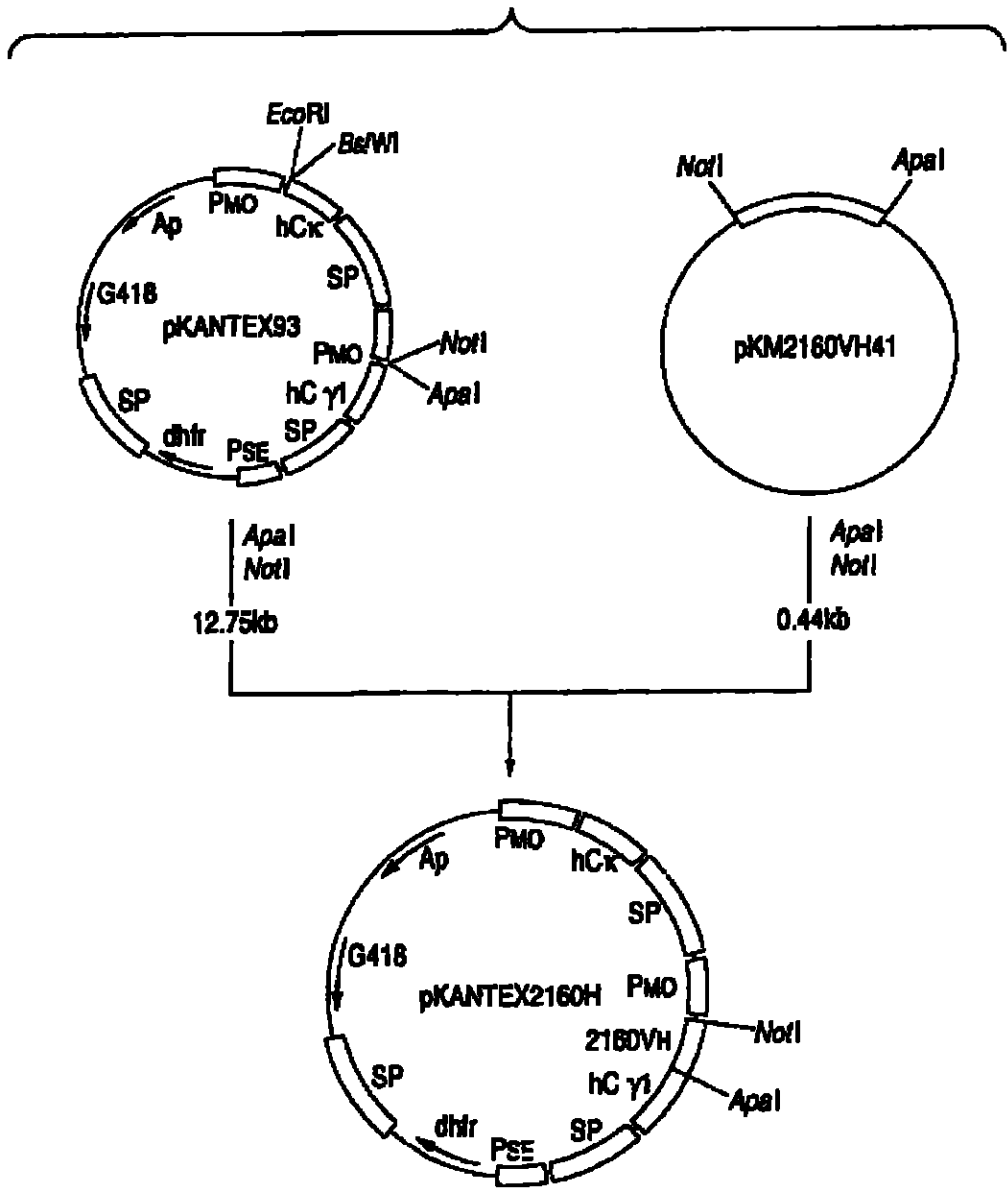


FIG. 15



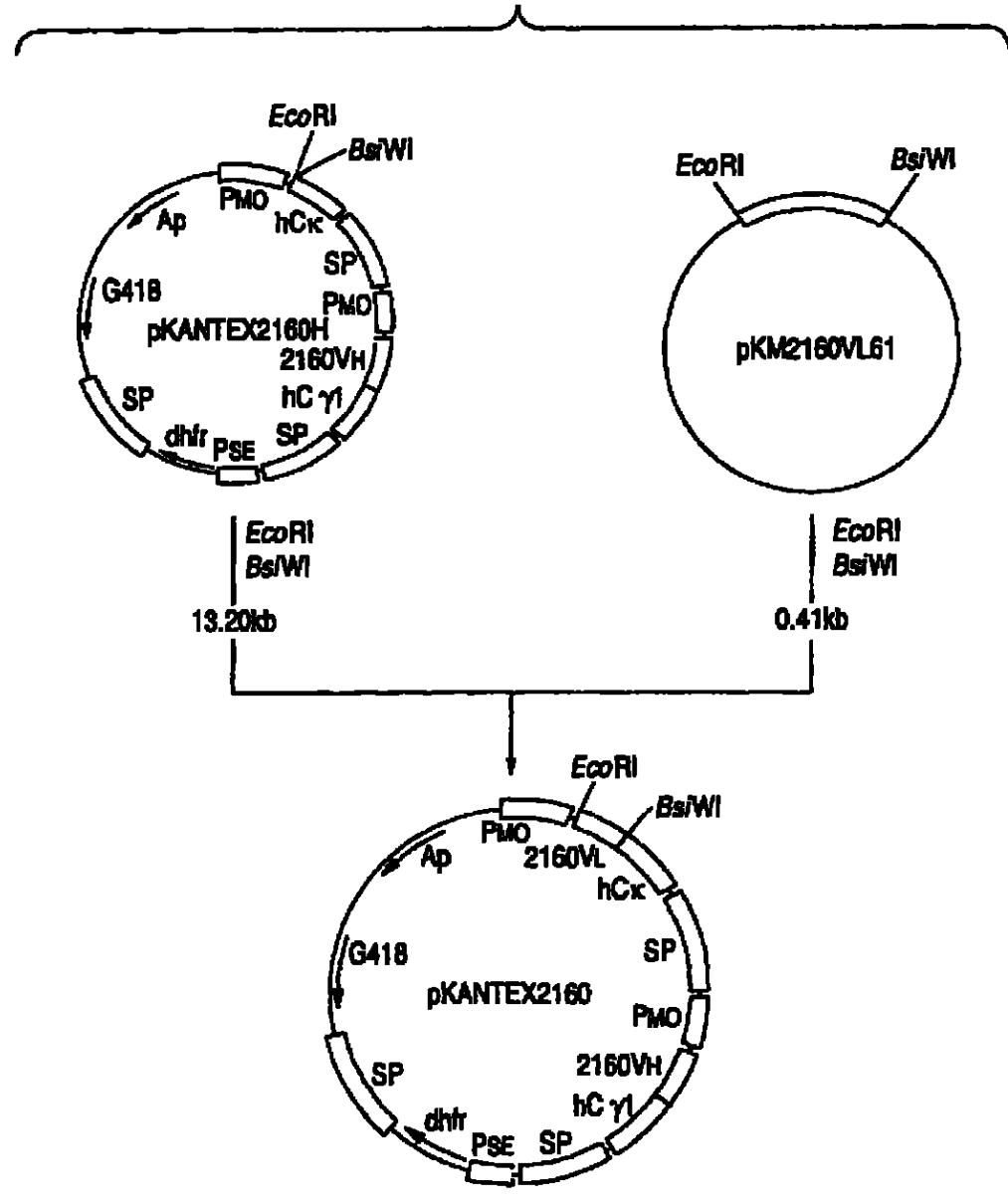
131

FIG. 16



425
132

FIG. 17



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Anticuerpo humano injertado en una CDR y fragmento de dicho anticuerpo

5

<130> P-41263

<150> JP 2001-265144

<151> 2001-08-31

10

<160> 78

<170> Patente Int. Ver. 2. 1

15

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 1

Asn Tyr Gly Met Ser

1 5

25

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

30

<213> Mus musculus

<400> 2

Thr Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

129

	1	5	10	15
	Gly			
5	<210> 3			
	<211> 10			
	<212> PRT			
	<213> Mus musculus			
10	<400> 3			
	His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr			
	1	5	10	
15	<210> 4			
	<211> 119			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
20	<220>			
	<223> Péptido sintético			
25	<400> 4			
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg			
	1	5	10	15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr			
30	20	25	30	
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45	
	Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val			
	50	55	60	

130

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 Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
5 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 5
 Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

 <210> 6
20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 6
25 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

 <210> 7
 <211> 9
30 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 7
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Phe Trp Thr

1 5

<210> 8
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10

<400> 8
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
15 20 25 30
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
20 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
25 100 105 110

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

440
137

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
5 20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
10 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 Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
15 100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
20 <211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Péptido sintético

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro 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 Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
5	85	90	95	
	Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115			
10	<210> 11			
	<211> 119			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
15	<220>			
	<223> Péptido sintético			
	<400> 11			
20	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg			
	1	5	10	15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr			
	20	25	30	
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val			
25	35	40	45	
	Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro 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
30	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
	85	90	95	
	Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			

442
139

115

<210> 12
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10

<400> 12
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
15 20 25 30
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
20 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
25 100 105 110

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

143
140

<400> 13
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
5 20 25 30
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
10 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
15 100 105 110

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

25 <400> 14
Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30
30 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

136

	65	70	75	80
	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Glu Gly			
	85	90	95	
	Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
5	100	105	110	
	<210> 15			
	<211> 19			
	<212> PRT			
10	<213> Mus musculus			
	<400> 15			
	Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly			
	1	5	10	15
15	Val Gln Cys			
	<210> 16			
	<211> 98			
	<212> ADN			
20	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> ADN sintético			
25	<400> 16			
	aacagctatg accatggcgg ccgcgaccc tcaccatgaa cctcgggcic agtttgattt			60
	tccttgccct catttanaa ggtgtccagt gtgaggtg			98
30	<210> 17			
	<211> 97			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			

445
142

	<220>		
	<223> ADN sintético		
	<400> 17		
5	atgaatccag aggcctgcaca ggagagcttc agggaccicc caggctgtac caagctccc	60	
	ccagactcca ccagctgcac ctacactgg acacctt	97	
	<210> 18		
	<211> 98		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> ADN sintético		
15	<400> 18		
	tgtcagcct ctggatcat tticaglaat tatggcatgt ctgggtccg ccaggctoca	60	
	gggaaggggc tggagtgggt cgaaccatt agtagtc	98	
20	<210> 19		
	<211> 98		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> ADN sintético		
	<400> 19		
	acaggaggt ctggcattg tctctggaga tgggaatcg tcccttaca ctgtctgat	60	
30	aataggata agtgctagca ctactaatgg ttgcgacc	98	
	<210> 20		
	<211> 98		
	<212> ADN		

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
5	<400> 20	
	acaatgccaa gaactccctg tatctgcaga tgaacagcct gagagtcgag gacacggccc	60
	tgtattactg tgcgagacat agcgaaggaa acttcgcg	98
10	<210> 21	
	<211> 96	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 21	
	gtaaaacgac ggccagtgga cccttggtgg aggcctgagga gacggcgacc agggctccct	60
20	ggccccata accaaacgcg aagttccat cgttat	96
	<210> 22	
	<211> 17	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
30	<400> 22	
	gatgggtcac gtatgg	17
	<210> 23	
	<211> 61	

104

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> ADN sintético	
	<400> 23	
	ctgtatctgc agatgaacag cctgagagtc gaggacacgg ccctgtatta ctgtgganga	60
	c 61	
10	<210> 24	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 24	
20	gataagttgc tagcactact aatgggttgcg acccactcca gccctctgtc tggagc	56
	<210> 25	
	<211> 19	
	<212> PRT	
25	<213> Mus musculus	
	<400> 25	
	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
	1 5 10 15	
30	Ser Ser Ser	
	<210> 26	
	<211> 92	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
5	<400> 26	
	aacagctatg accatggaa tgcctcttc aaatgaag tgcctgtag gctgttggtg	60
	ctgaigtct gatttctgc ttccagcagt ga	92
10	<210> 27	
	<211> 94	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 27	
	tagatctga ggagatggag gccggctctc caggggagc gggcaggag agggagact	60
20	gagtcacac gatctactg ctggagcag gaat	94
	<210> 28	
	<211> 92	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
30	<400> 28	
	ctccatctc tgcagatca gtccgaacat tttcatatt aatggigaca catattaga	60
	atggtaactg cagaagccag gccagtctc ac	92
	<210> 29	

	<211> 93	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 29	
	tggtcctgac ccacigccac tgaacctgtc tgggaccca gaaatcggt tgaacctt	60
10	atagatcagg agctgtggag actggcctgg ctt	93
	<210> 30	
	<211> 92	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
20	<400> 30	
	tggcagtggg tcaggcacag attcacact gaaatcagc agagtggagg ctgaggatgt	60
	tgggtttat tactgtttc aaggttact tc	92
	<210> 31	
25	<211> 91	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> ADN sintético	
	<400> 31	
	gtaaacgac ggccagtcic gacgtacgt ttgattcca cctgggtccc ttggccgac	60
	gtccacgga gaagtgaacc ttgaagcag t	91

	<210> 32	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
10	<400> 32	
	gtaaaacgac ggccagt	17
	<210> 33	
	<211> 94	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
20	<400> 33	
	tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcaggag agtggagact	60
	gagtcacac aacacactg ctggaagcag gaat	94
25	<210> 34	
	<211> 94	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 34	
	tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcaggag agtggagact	60

	gagtcacaa gatatcactg ctggaagcag gaat	94
	<210> 35	
	<211> 94	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
10	<400> 35	
	tagatctgca ggagaaggag gccgactcic caggggigac gggcagggag agtggagact	60
	gagtcacaa aacatcactg ctggaagcag gaat	94
15	<210> 36	
	<211> 28	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 36	
	Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser	
	1 5 10 15	
	Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys	
	20 25	
25	<210> 37	
	<211> 18	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 37	
	Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys	
	1 5 10 15	
	Pro Cys	

<210> 38
<211> 119
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10 <400> 38
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
15 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
20 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 His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
25 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 119
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

5 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

10 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro 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

15 85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

20

Q10 40

<211> 119

Q12 PRT

213 Secuencia artificial

25

220

<223> Péptido sintético

<400> 40

30 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

146

35 40 45
Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
5 65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
10 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 119
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético
20

<400> 41
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
30 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

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

5

◀210▶ 42

<211> 97

<12> ADN

◁13▷ Secuencia artificial

10

220

◀223▶ ADN sintético

<400> 42

15 gtgaatccag aggtctgcaca ggagagcttc agggaccccc caggctgtac caagcctccc 60
ccagactcca ccagctgcac ctacactgg acacatt 97

ccagactcca ccagctgcac ctacactgg acacctt

◀10▶ 43

<211> 98

20 <212> ADN

213 Secuencia artificial

◀220▶

223 ADN sintético

25

<400> 43

tctcagcct ctgattcac cttagtaat tatggcatg ctgggtccg ccaggctcca 60

ggagaggggc tggagtgggt ccaaccatt agtagtgc 98

30 **◀210▶ 44**

<211> 98

212 ADN

◁213▷ Secuencia artificial

	<220>		
	<223> ADN sintético		
	<400> 44		
5	acagcgtgtt ctgggaattg tctctggaga tgggaaatcg tcccttcaca ctgctcggat	60	
	aataggaata agtgcctagca ctactaatgg ttgagacc	98	
	<210> 45		
	<211> 98		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> ADN sintético		
15	<400> 45		
	acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg	60	
	tgtattactg tgcgagacat agcgaaggaa acttcgcg	98	
20	<210> 46		
	<211> 98		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> ADN sintético		
	<400> 46		
	tgtgcagcct ctggattcat tticagtat tatggcatgi ctgggtccg ccaggctcca	60	
30	gggaaggggc tggagtggtg ctcaaccatt agtagtgc	98	
	<210> 47		
	<211> 98		
	<212> ADN		

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

5

4

<400> 47

acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg 60
tgtattactg tggagagcat agcgaaggaa acttcgcg 98

10

<210> 48

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 48

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

Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met
30 100 105 110
Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val
115 120 125
Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe
130 135 140

158
155

150

Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala
145 150 155 160
Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser
 165 170 175
5 Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser
 180 185 190
Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile
 195 200 205
Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met
10 210 215 220
Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala
225 230 235 240
Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr
 245 250 255
15 Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val
 260 265 270
Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
 275 280 285
Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
20 290 295 300
Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
305 310 315 320
Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
 325 330 335
25 Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
 340 345 350
Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
 355 360

- 30 . <210> 49
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

	<220>	
	<221> CDS	
	<222> 1. 357	
	<223> ADN sintético	
5	<400> 49	
	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg	48
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg	
	1 5 10 15	
10	tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat	96
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr	
	20 25 30	
	ggc atg tct tgg gtc cgc cag get cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc	144
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
15	35 40 45	
	gca acc att agt agt get age act tat tee tat tat cca gac agt gtg	192
	Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val	
	50 55 60	
	aag gga cga ttc acc atc tee aga gac aat gcc aag aac tee ctg tat	240
20	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
	65 70 75 80	
	ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt	288
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
25	gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga	336
	Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly	
	100 105 110	
	acc ctg gtc acc gtc tee tea	357
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
30	115	
	<210> 50	
	<211> 357	
	<212> ADN	

150
157

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

5 <222> 1. 357

<223> ADN sintético

<400> 50

	gag gtg cag ctg gtc gag tet ggg gga gac ttc gta cag cct ggg agg	48
10	Glu Val Gln Leu Val ¹ Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg	
	1 5 10 15	
	tec ctg aga etc tee tgt gca gcc tet gga ttc att ttc agt aat tat	96
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr	
	20 25 30	
15	ggc atg tet tgg gtc cgc cag get cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc	144
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
	gca acc att agt agt get agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtc	192
	Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val	
20	50 55 60	
	aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat	240
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
	65 70 75 80	
	ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt	288
25	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga	336
	Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly	
	100 105 110	
30	acc ctg gtc acc gtc tcc tca	357
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115	

<210> 51

	<211> 357	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<221> CDS	
	<222> 1.357	
	<223> ADN sintético	
10	<400> 51	
	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gln cag cct ggg agg	48
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg	
	1 5 10 15	
	tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat	96
15	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr	
	20 25 30	
	ggc atg tct tgg gtc cgc cag get cca gac aag agg ctg gag tgg gtc	144
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
20	gca acc att agt agt get agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg	192
	Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val	
	50 55 60	
	aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat	240
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
25	65 70 75 80	
	ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt	288
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga	336
30	Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly	
	100 105 110	
	acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115	

	<210>	52	
	<211>	357	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<221>	CDS	
	<222>	1 . 357	
10	<223>	ADN sintético	
	<400>	52	
		gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg	48
		Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg	
15		1 5 10 15	
		tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat	96
		Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr	
		20 25 30	
20		ggc atg tct tgg gtc cgc cag get cca gac aag agg ctg gag tgg gtc	144
		Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val	
		35 40 45	
		gca acc att agt agt get agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg	192
		Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val	
25		50 55 60	
		ang gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc ang aac tcc ctg tat	240
		Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
		65 70 75 80	
		ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt	288
30		Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	
		85 90 95	
		gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga	336
		Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly	
		100 105 110	

160

	acc ctg gtc acc gtc tcc tca	357
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115	
5	<210> 53	
	<211> 336	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<221> CDS	
	<222> l. 336	
	<223> ADN sintético	
15	<400> 53	
	gat atc gig atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga	48
	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
	1 5 10 15	
	gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt egg aac att gtt cat att	96
20	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile	
	20 25 30	
	aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct	144
	Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
	35 40 45	
25	cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca	192
	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
	50 55 60	
	gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc	240
	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
30	65 70 75 80	
	age aga gig gag get gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt	288
	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	
	85 90 95	
	tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	336

110

◁213▷ Secuencia artificial

223 ADN sintético

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

165
162

	100	105	110	
	<210> 55			
	<211> 336			
5	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<221> CDS			
10	<222> 1. 336			
	<223> ADN simético			
	<400> 55			
	gat ate ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc oct gga			48
15	Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly			
	1	5	10	15
	gag ccg gcc tee ate tee tgc aga tet agt egg aac att gtt cat att			96
	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile			
	20	25	30	
20	aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tet			144
	Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45	
	cca cag ctc ctg ate tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca			192
25	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
	50	55	60	
	gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa ate			240
	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
	65	70	75	80
30	age aga gtg gag get gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt			288
	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly			
	85	90	95	
	tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa ate aaa			336
	Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			

	100	105	110	
	<210> 56			
	<211> 336			
5	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<221> CDS			
10	<222> 1. 336			
	<223> ADN sintético			
	<400> 56			
	gat gtt ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga			48
15	Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly			
	1	5	10	15
	gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att			96
	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile			
	20	25	30	
20	aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct			144
	Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45	
	cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca			192
	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
25	50	55	60	
	gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc			240
	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
	65	70	75	80
	agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt			288
30	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly			
	85	90	95	
	tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa			336
	Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys			
	100	105	110	

16A

	<210> 57				
	<211> 357				
	<212> ADN				
5	<213> Secuencia artificial				
	<220>				
	<221> CDS				
	<222> l. 357				
10	<223> ADN sintético				
	<400> 57				
	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg				48
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly				
15	1	5	10	15	
	tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat				96
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr				
	20	25	30		
	ggc atg tct tgg gtc cgc cag get cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc				144
20	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				
	35	40	45		
	tca acc att agt agt get agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg				192
	Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val				
	50	55	60		
25	aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat				240
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr				
	65	70	75	80	
	ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt				288
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
30	85	90	95		
	gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga				336
	Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly				
	100	105	110		
	acc ctg gtc acc gtc tcc tca				357

165, 168

	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	115				
	<210> 58				
5	<211> 357				
	<212> ADN				
	<213> Secuencia artificial				
	<220>				
10	<221> CDS				
	<222> 1..357				
	<223> ADN sintético				
	<400> 58				
15	gag ggg cag ctg ggg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg				48
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly				
	1	5	10	15	
	tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat				96
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr				
20	20	25	30		
	ggc atg tct tgg gtc cgc cag get cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc				144
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				
	35	40	45		
	tca acc att agt agt get agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg				192
25	Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val				
	50	55	60		
	aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat				240
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr				
30	65	70	75	80	
	ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt				288
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90	95		
	gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg tti ggt tat tgg ggc cag gga				336

	Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly	
	100 105 110	
	acc ctg gtc acc gtc tcc tca	357
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
5	115	
	<210> 59	
	<211> 357	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> 1. 357	
15	<223> ADN sintético	
	<400> 59	
	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg	48
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
20	1 5 10 15	
	tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat	96
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
	20 25 30	
	ggc atg tct tgg gtc cgc cag get cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc	144
25	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
	tca acc att agt agt get agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg	192
	Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val	
	50 55 60	
30	aag gga cga ttc acc ate tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat	240
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
	65 70 75 80	
	ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	

162

	85	90	95	
	gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga			336
	Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110	
5	acc ctg gtc acc gtc tcc tea			357
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115			
	<210> 60			
10	<211> 357			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
15	<221> CDS			
	<222> 1.357			
	<223> ADN simético			
	<400> 60			
20	gag gfg cag ctg gfg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg			48
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
	1	5	10	15
	tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt ant tat			96
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr			
25	20	25	30	
	ggc atg tct tgg gtc cgc cag get cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc			144
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45	
	tca acc att agt agt get agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg			192
30	Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val			
	50	55	60	
	aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac ant tcc aag aac acg ctg tat			240
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
	65	70	75	80

	ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tag ggc cag gga	336
5	Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly	
	100 105 110	
	acc ctg gtc acc gtc tcc tca	357
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115	
10	<210> 61	
	<211> 414	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
15	<220>	
	<221> CDS	
	<222> 1. 414	
20	<400> 61	
	atg aac ctc ggg ctc agt ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt	48
	Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly	
	1 5 10 15	
	gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta atg aag	96
25	Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys	
	20 25 30	
	cct gga ggg tcc ctg aaa atc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc	144
	Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe	
	35 40 45	
30	agt aat tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac atg agg ctg	192
	Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu	
	50 55 60	
	gaa tgg gtc gca acc att agt agt get agt act tat tcc tat tat cca	240
	Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro	

122
169

164

	65	70	75	80	
	gac agt gtg aag gga cga ttc acc ata tcc agg gac aac gcc gag aac				288
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn				
		85	90	95	
5	tcc cia tat ctg caa atg aat agt ctg agg tot gag gac aca ggc ata				336
	Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile				
		100	105	110	
	tat tac tgt gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg				384
	Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp				
10		115	120	125	
	ggc cga ggg act ctg gtc act gtc tct gca				414
	Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala				
		130	135		
15	<210> 62				
	<211> 138				
	<212> PRT				
	<213> Mus musculus				
20	<400> 62				
	Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly				
	1	5	10	15	
	Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys				
		20	25	30	
25	Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe				
	35	40	45		
	Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu				
	50	55	60		
	Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro				
30	65	70	75	80	
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn				
		85	90	95	
	Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile				
		100	105	110	

125

135

◁213▷ **Mus musculus**

<222> 1.396

48

15

96

30

144

45

192

60

240

80

288

95

336

	Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys	
	100105110	
	ttt caa ggt tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc agg ctg	384
	Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu	
5	115120125	
	gaa atc aga cgg	396
	Glu Ile Arg Arg	
	130	
10	<210> 64	
	<211> 132	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
15	<400> 64	
	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
	151015	
	Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val	
	202530	
20	Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile	
	354045	
	Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro	
	505560	
	Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
25	65707580	
	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
	859095	
	Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys	
	100105110	
30	Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu	
	115120125	
	Glu Ile Arg Arg	
	130	

	<210> 65	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 65	
10	aggaaaaa gggccgcca cccctacca tgaacctg	39
	<210> 66	
	<211> 39	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
20	<400> 66	
	cgtggggcc ttgtggagg ctgcagagc agtgaccag	39
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<210> 67	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
30	<400> 67	
	ccggantcg cctctcaaa atgaagtgc c	31
	<210> 68	

	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 68	
10	agccaccgta cgtctgattt ccagcctggt g	31
	<210> 69	
	<211> 97	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 69	
20	atgattccag aggtgcaca ggagagcttc agggacccc caggctgtac caggctccc	60
	ccagactcca ccagctgcac ctacactgg acacctt	97
	<210> 70	
	<211> 28	
25	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
30	<400> 70	
	Aan Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser	
	1 5 10 15	
	Aan Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys	

126
174

	20	25
	<210> 71	
	<211> 18	
5	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
10	<400> 71	
	Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys	
	1	5 10 15
	Pro Cys	
15	<210> 72	
	<211> 17	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 72	
25	Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro	
	1	5 10 15
	Cys	
	<210> 73	
30	<211> 16	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

<223> Péptido sintético

<400> 73

Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys

5 1 5 10 15

Q1074

<211> 15

Q12 PRT

10 <213> Secuencia artificial

220

<223> Péptido sintético

15 <400> 74

Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys

1 5 10 15

◀210▶ 75

20 <211> 14

Q12 PRT

◁13▷ Secuencia artificial

220

25 **◁223▷** Péptido sintético

<400> 75

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Cys

1 5 10

30

◀10▶ 76

<211> 13

212 PRT

◁213▷ Secuencia artificial

178
176

	<220>
	<223> Péptido sintético
5	<400> 76
	Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Cys
	1 5 10
	<210> 77
10	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
15	<223> Péptido sintético
	<400> 77
	Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Cys
	1 5 10
20	<210> 78
	<211> 11
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
25	<220>
	<223> Péptido sintético
	<400> 78
30	Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Cys
	1 5 10

179
177

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

USUARIO RADICADOR

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.
- Descripción de la invención.
- Dibujos de ser estos pertinentes.
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.

() ()
() ()
() ()
() ()
() ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de 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 ()

INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

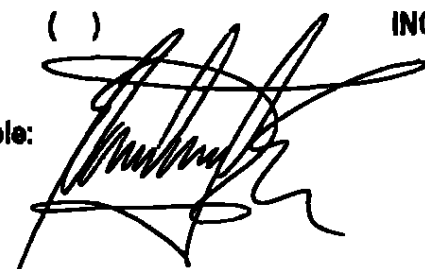
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.
- Representación gráfica del esquema de trazado
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.

() ()
() ()
() ()
() ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

Firma Responsable:



Fecha:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 04017609 00000000 Folios: 178
Fecha (MM): 2004-02-27 12:27:46
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

180
178

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
HUMBERTO RUBIO CAMACHO
Apoderado
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

Oficio N°

00375

ASUNTO:

Radicación N°	04-17609
Solicitud internacional	PCT/JP02/08828
Fecha inicio fase nacional	31/03/2004
Trámite	011
Evento	379
Actuación	416
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica.
- El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al Capítulo I ó II del PCT, porque la indicación en el petitorio no corresponde a los documentos del expediente, en caso necesario adjuntar los documentos que corresponden.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMEN ACÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

202044

06 AGR. 2024

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Commutador: 3 820840 Fax: 3 505220
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 505220. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia