



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-014090-A-00000-0000

Fecha: 2013-02-27 16:50:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 70

DELEGATURA DE PRC

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

10-14090A

SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: UN ANTICUERPO ANTI CD37 DERIVADO DE UN ANTICUERPO
MONOCLONAL MURINO

SOLICITANTE: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

EXPEDIENTE No. 10-014.090A

DIRECCIÓN: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 21 de Junio de 2011

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-014090-00000-0000
Fecha: 2010-02-09 16:59:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO PATENTE PC ENTRADA EN FASE N° SOLICITUD

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-014090-A-00000-0000
Fecha: 2013-02-27 16:50:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 70

1



Patente de Invención.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM INTER
NATIONAL GMBH

Dirección: Binger Strasse 173, 55216
Ingelheim

Nacionalidad o Domicilio: Alemana

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Diagonal 34 No. 5-28

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: 1) Karl-Heinz HEIDER, 2) Eric BORGES,
3) Elinborg OSTERMAN

Dirección: Boehringer Ingelheim Gmbh, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216
Ingelheim Am, Rhein

Nacionalidad o Domicilio: 1y2) Alemana 3) Austriaco

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/060464

Fecha Agosto 8, 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/019312

Fecha Febrero 12, 2009

6

Título (54) ANTICUERPOS ANTI-CD37 (F. 254)

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28, A61P 35/02, A61K 39/395, C12N 5/00

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

Agosto 9, 2007

(31) Número de Solicitud

07114128.7

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-014090-00006-0000

Fecha: 2011-06-21 16:28:17

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 444 RESPUESTAREQUE

Folios: 69

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Ref: Expediente No. 10-014.090

Solicitud de patente titulada: "UN ANTICUERPO ANTI CD37 DERIVADO DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL MURINO."

Solicitante: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

Nuestra Ref: COP 100001-2009 A

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente:

1. Me permito presentar una **SOLICITUD DIVISIONAL A**, para la solicitud de patente en referencia.

Atentamente,

CARLOS R. OLARTE
C.C. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexo: Solicitud Divisional

Diagonal 34 No. 5 - 28 Bogotá D.C., Colombia.

Tel: + 57 (1) 601-7700 Fax: + 57 (1) 601-7799 e-mail: office@olartemoure.com

www.olartemoure.com

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

COP 100001-2009 A

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM INTER
NATIONAL GMBH

Dirección: Binger Strasse 173, 55216
Ingelheim

Nacionalidad o Domicilio: Alemana

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ **NIT** ☐

C.E. ☐ **Otro** ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Diagonal 34 No. 5-28

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ **NIT** ☐

C.E. ☐ **Otro** ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: 1) Karl-Heinz HEIDER, 2) Eric BORGES,
3) Elinborg OSTERMAN

Dirección: Boehringer Ingelheim Gmbh, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216
Ingelheim Am, Rhein

Nacionalidad o Domicilio: 1y2) Alemana 3) Austriaco

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/060464

Fecha Agosto 8, 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/019312

Fecha Febrero 12, 2009

6

**Título (54) UN ANTICUERPO ANTI CD37 DERIVADO DE UN ANTICUERPO
MONOCLONAL MURINO**

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28, A61P 35/02, A61K 39/395, C12N 5/00

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

Agosto 9, 2007

(31) Número de Solicitud

07114128.7

9

Comprobante de pago No. 11-

Fecha 21 de Junio de 2011

10

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. Ver Expediente Original No. 10-014.090

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Ver Expediente Original No. 10-014.090

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos). Ver Expediente Original No. 10-014.090

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos). Secuencias.

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA). (IPRP)

☐

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. Búsqueda Internacional. Ver Expediente Original No. 10-014.090

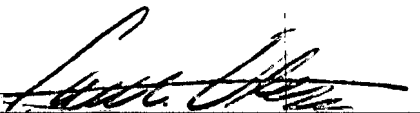
11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.376.996 Btá T.P. 135.799

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

S
A
B

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0048972
		Bogotá D.C., Mayo 23 de 2011 - 08:42:24

RECIBIDO DE : OLARTERAISBECK	NI 830.122.870
------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	16430	23/02/2011		571.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-014098-00006-8000
Fecha: 2011-06-21 16:28:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 69

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-014090-A-00000-0000
Fecha: 2013-02-27 16:50:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 70

5
6

Anticuerpos Anti-CD37

5 Introducción

La presente invención se refiere a inmunoterapias que están basadas en la supresión de las células B. En particular, la presente invención se refiere a moléculas de anticuerpo anti-CD37 para utilizarse en dichas terapias, por ejemplo, en el
10 tratamiento de las malignidades de las células B y condiciones autoinmunes.

La inmunoterapia que utiliza anticuerpos monoclonales (mAb) ha surgido como un método seguro y selectivo para el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades. En particular, el papel de los anticuerpos monoclonales en las terapias que están basadas en la supresión de las células B, por ejemplo, en el tratamiento de las
15 malignidades de las células B, se ha extendido desde la introducción de rituximab (Rituxan®), un anticuerpo que está dirigido frente al antígeno CD20 de la superficie de las células B. Numerosos estudios han confirmado la eficacia de rituximab como un agente único y en terapia de combinación en NHL de bajo grado (Hiddemann et al., 2005a; Hiddemann et al., 2005b; Hainsworth 2004; McLaughlin et al., 1998), linfoma
20 de células del manto (Forstpointner et al., 2004; Kahl et al., 2006; Foran et al., 2000; Howard et al., 2002; Romaguera et al., 2005), linfoma de células grandes difusas (DLCL) (Coiffier et al., 1998; Feugier et al., 2005) y leucemia/linfoma de Burkitt (Thomas et al., 2006). Sin embargo, sólo un subconjunto de pacientes responde a la
25 terapia y la mayoría de éstos recae eventualmente después del tratamiento con rituximab. Por lo tanto, se han buscado nuevas dianas terapéuticas en las células B que son más eficaces potencialmente que CD20 para la terapia de las malignidades de las células B (Zhao et al., 2007).

El antígeno CD37 es un antígeno de la superficie celular que no se ha considerado, hasta ahora, como una diana para las malignidades de las células B en el mismo
30 grado que el antígeno CD20 de las células B.

CD37, un miembro de la superfamilia de la tetraspanina, es una molécula de la superficie celular altamente glicosilada con cuatro dominios transmembrana y dos bucles extracelulares. CD37 se expresa casi exclusivamente en las células B maduras, con los niveles de expresión más altos en las células B de la sangre periférica, niveles
35 reducidos en las células plasmáticas y niveles no detectables en las células B precursoras CD10+ en la médula ósea. También se ha mostrado un nivel bajo de

expresión de CD37 en células T sin activar y activadas, granulocitos y monocitos. En los neoplasmas de células B, la expresión de CD37 se observa principalmente en el linfoma no-Hodgkin agresivo (NHL) y en leucemia linfocítica crónica (CLL). También se ha encontrado un nivel alto de expresión de CD37 en el linfoma de células del manto (MCL). Este patrón de expresión hace a CD37 una diana atractiva para una terapia de

CD37 se describió por primera vez en 1986 y se caracterizó con el anticuerpo monoclonal murino MB-1 (Link et al., 1986).

El papel fisiológico de CD37 no se conoce. Los ratones deficientes en CD37 no presentan cambios en el desarrollo ni en la composición celular de los órganos linfoides, pero tienen niveles reducidos de IgG1 y reacciones inmunes mediadas por células T atenuadas (Knobeloch et al., 2000). Los estudios con células T CD37^{-/-} sugieren un papel para CD37 en la proliferación de las células T (van Spriel et al., 2004).

Se ha mostrado la expresión de CD37 en células B malignas de varias enfermedades. CD37 se expresa en la mayoría de las malignidades de las células B maduras como linfoma de Burkitt, linfoma folicular y linfoma linfocítico (Link et al., 1986). Se han observado unos niveles altos de expresión de CD37 en leucemia de células vellosas y en muestras de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) y diferentes subtipos de linfoma no-Hodgkin (NHL) incluyendo linfoma de células del manto (MCL) (Schwartz-Albiez et al., 1988; Barrena et al., 2005). Una publicación que utiliza una micromatriz de anticuerpo para inmunofenotipado reivindica que CD37 es un buen discriminador entre células CLL malignas (alta expresión de CD37) y linfocitos normales de sangre periférica (PB) (baja expresión de CD37) (Belov et al., 2001).

La unión de un mAb específico de CD37 a células cancerosas puede desencadenar varios mecanismos de acción: En primer lugar, después de que el anticuerpo se haya unido al dominio extracelular del antígeno CD37, puede activar la cascada del complemento y lisar la célula diana. En segundo lugar, un anticuerpo anti-CD37 puede mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) en la célula diana, que se produce después de que la parte Fc del anticuerpo unido sea reconocida por receptores apropiados en las células citotóxicas del sistema inmune.

En tercer lugar, el anticuerpo puede alterar la capacidad de las células B para responder al antígeno o a otros estímulos. Finalmente, el anticuerpo anti-CD37 puede iniciar la muerte celular programada (apoptosis).

6
7/12

El mAb anti-CD37 MB-1 se evaluó en dos ensayos de radioinmunoterapia en pacientes con B-NHL (linfoma de células B no-Hodgkin; Press et al., 1989; Kaminski et al., 1992). Se administraron dosis terapéuticas de ¹³¹I-MB-1 a 6 pacientes con recaída de NHL en un ensayo y los 6 pacientes consiguieron una remisión clínica completa (CR) con una duración media de 7 meses. Es importante que dos de los seis pacientes mostraron regresiones clínicas después de la administración de sólo la dosis trazadora de MB-1 lo que sugiere un efecto antitumoral directo del anticuerpo en sí mismo. En el segundo ensayo, se aplicó MB-1 marcado radiactivamente para el tratamiento de pacientes refractarios con NHL y resultó que en 3 de 9 pacientes evaluables se obtuvieron respuestas objetivas de duración limitada (Kaminski et al., 1992). En ambos ensayos, se mostró una supresión rápida y transitoria de células B periféricas después de la inyección de la dosis trazadora de anticuerpo MB-1 marcado. Estas observaciones apoyan la conclusión de que MB-1 ejerce una actividad citotóxica por sí mismo. En resumen, estos ensayos clínicos recalcan la factibilidad de la utilización de CD37 como diana para las malignidades de las células B y apuntan a una relevancia clínica potencial de la terapia anti-CD37.

Existe una evidencia experimental con una molécula de cadena única semejante al anticuerpo específico de CD37 ("Small Modular ImmunoPharmaceutical", SMIP) de que el tratamiento con esa molécula induce la apoptosis *in vitro* y retrasa el crecimiento del linfoma de Burkitt en un modelo de xenotransplante *in vivo*. Recientemente, se ha descrito la actividad anti-apoptótica de SMIP Tru16.4 anti-CD37 recombinante de Trubion (Zhao et al., 2004). Tru 16.4 indujo la apoptosis independiente de caspasas en células CLL primarias de pacientes con tumor. La inducción de la apoptosis en estas células fue mayor que la de Rituximab y comparable con la de Alemtuzumab, un antagonista de CD52. El grado de la inducción de la apoptosis fue directamente proporcional a la expresión de CD37 en la superficie celular y podría aumentarse más por el entrecruzamiento con un anticuerpo anti-IgG humana. Se demostró una correlación de la expresión de CD37 y ADCC en líneas celulares *in vitro*. En un modelo de linfoma de Burkitt en ratón (Raji) el tratamiento con scFv anti-CD37 reveló eficacia terapéutica (Zhao et al., 2007). Estos datos proporcionan la primera evidencia de que la utilización de CD37 como diana es un método prometedor para la terapia antitumoral dirigida por la inducción de apoptosis y ADCC.

En conclusión, se ha mostrado que el antígeno CD37 se expresa frecuentemente en células tumorales en varias malignidades de las células B humanas

y en linfocitos B normales maduros y que la terapia basada en anti-CD37 puede ser un método prometedor para tratar las malignidades de las células B. La supresión de las células B normales CD37-positivas no se considera crítica ya que los datos clínicos de numerosos pacientes muestran que incluso la supresión prolongada de células B de hasta 6 meses con un mAb anti-CD20 no reduce significativamente los niveles séricos de IgG ni incrementa el riesgo de infecciones (Van der Kolk et al., 2002).

Aunque los anticuerpos o moléculas semejantes a anticuerpos anti-CD37 descritos anteriormente (MB-1 y SMIP Tru16.4) han mostrado una eficacia antitumoral en malignidades de las células B y el potencial de actuar sobre CD37, existe una necesidad de inhibidores alternativos anti-CD37 para mejorar las terapias basadas en la supresión de las células B.

Sumario de la invención

Era un objeto de la invención proporcionar antagonistas de CD37 nuevos para el tratamiento de las malignidades de las células B y otros trastornos que responden a la supresión de las células B CD37 positivas.

Además, era un objeto de la invención proporcionar anticuerpos anti-CD37 con funciones efectoras mejoradas. En particular, los inventores buscaron proporcionar mAb anti-CD37 con citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

Para resolver el problema que subyace a la invención, se utilizó un anticuerpo monoclonal murino anti-CD37 como anticuerpo de partida para generar anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados que son útiles en la terapia humana.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a CD37 humano y que se obtiene a partir de

- a) un anticuerpo monoclonal murino que está definido por
 - i. una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2; y
 - ii. una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4, o a partir de
 - b) un anticuerpo no humano que reconoce el mismo epítipo de CD37 humano que el anticuerpo definido en a) o que reconoce un epítipo que está cerca de o se superpone con dicho epítipo;
- en el que dicha molécula de anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

2
03

Como se entenderá a partir de lo que sigue, un anticuerpo que se "deriva" de otro anticuerpo, es decir, el anticuerpo de partida, significa que dicho anticuerpo ha sido generado por modificación del anticuerpo de partida según se describe más abajo.

5 En una realización preferida, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo quimérica o humanizada que se deriva del anticuerpo de partida definido en a). Un anticuerpo con una secuencia relacionada se designó G28.1 y se describió en WO 2005/017148.

10 El anticuerpo de partida de la categoría b) puede seleccionarse, por ejemplo, de los anticuerpos específicos de CD37 que caracterizaron, como G28.1, el antígeno CD37 en el Third HLDA Workshop; estos anticuerpos se designaron HD28, HH1, BI14, F97-3G6 (Ling y MacLennan, 1987). Otros anticuerpos específicos de CD37 que se han descrito incluyen RFB-7, Y29/55, MB-1, M-B371, M-B372 e IPO-24. Según Moldenhauer, 2000 y Schwartz-Albiez et al., 1988, todos estos anticuerpos (incluyendo
15 G28.1) reconocen el mismo epítipo de CD37 o uno que se superpone o está cerca. Schwartz-Albiez et al., 1988, indica que el epítipo está situado en el resto de carbohidrato de CD37. Varios de los anticuerpos anteriores se pueden conseguir comercialmente, por ejemplo, HH1 (SantaCruz), RFB-7 (Biodesign), Y29/55 (Biogenesis), M-B371 (BD Biosciences), M-B372 (SantaCruz) e IPO-24 (AbCam).

20 Otros anticuerpos específicos de CD37 son S-B3 (Biosys), NMN46 (Chemicon) e ICO-66 (Bioprobe). Puede determinarse si un anticuerpo reconoce el mismo epítipo que G28.1 por ensayos de unión competitiva o por radioinmunoensayos de inhibición cruzada como describen Moldenhauer et al., 1987 y Moldenhauer, 2000.

Como ejemplo, la unión competitiva puede determinarse en un ELISA,
25 utilizando placas recubiertas con la proteína CD37 o péptidos de CD37 o con células CD37 positivas (ELISA Celular) y midiendo la unión de un anticuerpo biotinilado en presencia de un anticuerpo competidor candidato. En presencia de un anticuerpo o fragmento obtenido de un anticuerpo competidor, la unión de G28.1 biotinilado (u otro anticuerpo que se sabe que reconoce el mismo epítipo) se reduce en el caso en el
30 que el anticuerpo reconozca un epítipo compartido. Para identificar el péptido del epítipo de G28.1, pueden sintetizarse o producirse fragmentos o polipéptidos cortos o proteínas recombinantes obtenidos a partir de la secuencia de CD37 y medirse la unión de G28.1 a dichos péptidos/polipéptidos en un ensayo ELISA. La unión competitiva también puede determinarse por análisis FACS, como se describe en los
35 Ejemplos.

Puede utilizarse un anticuerpo definido en b) de una manera análoga a G28.1 como anticuerpo de partida para la generación de moléculas de anticuerpo quiméricas o humanizadas.

5 Un anticuerpo de partida de la categoría b) también puede generarse *de novo* mediante la utilización de péptidos o fragmentos de proteína que contienen el epítipo relevante o moléculas de ADN que codifican dichos péptidos/fragmentos, respectivamente, para inmunización con el fin de obtener anticuerpos reactivos con el mismo epítipo que G28.1.

10 Un anticuerpo de partida b) también puede obtenerse mediante inmunización con células enteras que poseen el epítipo relevante; las células de hibridoma así obtenidas se criban para la unión competitiva de los anticuerpos secretados.

El término "molécula de anticuerpo anti-CD37" engloba anticuerpos anti-CD37 y fragmentos de anticuerpos anti-CD37 así como conjugados con moléculas de anticuerpo. Los anticuerpos incluyen, en el significado de la presente invención, 15 anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados. El término "anticuerpo", que puede utilizarse de manera intercambiable con "molécula de anticuerpo", englobará inmunoglobulinas completas (como se producen por los linfocitos y, por ejemplo, están presentes en el suero sanguíneo), anticuerpos monoclonales secretados por líneas celulares de hibridomas, polipéptidos producidos por expresión recombinante en 20 células anfitrionas, que tienen la especificidad de unión de las inmunoglobulinas o anticuerpos monoclonales, y moléculas que se han obtenido a partir de dichos anticuerpos por modificación o procesamiento adicional aunque reteniendo su especificidad de unión.

25 En una realización de la invención, la molécula de anticuerpo anti-CD37 es un anticuerpo quimérico definido por

- i) una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;
- ii) una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4;
- 30 iii) cadenas pesadas y ligeras constantes que son de origen humano.

La construcción y producción de anticuerpos quiméricos ratón/humano es muy conocida en la técnica (Boulianne et al., 1984). Las regiones variables del anticuerpo no humano se unen típicamente a al menos una parte (F_c) de la región constante de la inmunoglobulina de una inmunoglobulina humana. Las secuencias de ADN de la 35 región constante humana se pueden aislar según procedimientos muy conocidos a

8
09

partir de varias células humanas, preferiblemente a partir de células B inmortalizadas (véanse Kabat et al., 1991; y WO 87/02671). Las moléculas de anticuerpo pueden contener toda o una parte de la región constante siempre que exhiban una unión específica al antígeno CD37 y a los receptores Fc. La elección del tipo y longitud de la
5 región constante depende de si se desean funciones efectoras como fijación de complemento o toxicidad celular mediada por células dependiente de anticuerpo y de las propiedades farmacológicas deseadas de la molécula de anticuerpo.

En determinadas realizaciones, la molécula de anticuerpo de la invención es un anticuerpo específico de CD37 quimérico que tiene la región variable de la cadena
10 pesada de un anticuerpo no humano definido en a) o b) fusionada con la región constante de la cadena pesada IgG1 humana y la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo no humano definido en a) o b) fusionada con la región constante de la cadena ligera kappa humana.

En otra realización más, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo específico
15 de CD37 quimérico que tiene la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO:2 fusionada con la región constante de la cadena pesada IgG1 humana que es una molécula de IgG1 con la secuencia mostrada en SEQ ID NO:24 (secuencia de ADN codificante: SEQ ID NO:23) o una molécula de IgG1 mutada obtenida a partir de ésta y tiene la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO:4
20 fusionada con la región constante de la cadena ligera kappa humana mostrada en SEQ ID NO:26 (secuencia de ADN codificante: SEQ ID NO:25).

Otras regiones constantes humanas para quimerizar un anticuerpo de partida no humano definido en a) o b) están disponibles para el experto en la técnica, por ejemplo, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE o IgM (en lugar de IgG1) o lambda (en lugar de
25 kappa). Las regiones constantes también pueden ser quiméricas, por ejemplo, una quimera de cadena pesada IgG1/IgG2 o IgG1/IgG3.

En determinadas realizaciones de la invención, la molécula de anticuerpo anti-CD37 es un anticuerpo humanizado que está definido por

- 30 i. CDR contenidas en la cadena pesada variable como se muestra en SEQ ID NO:2
y por
ii. CDR contenidas en la cadena ligera variable como se muestra en SEQ ID NO:4,
35 iii. marcos que soportan dichas CDR que se obtienen a partir de un anticuerpo

humano,

- iv. cadenas pesadas y ligeras constantes que son de un anticuerpo humano.

Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, anticuerpos murinos, de rata o conejo) son inmunoglobulinas, cadenas de
5 inmunoglobulinas o fragmentos de éstas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras moléculas de unión a antígenos con subsecuencias de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas obtenidas a partir de inmunoglobulinas no humanas.

Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (del anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la
10 complementariedad (CDR) del anticuerpo receptor se han reemplazado por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes.

15 En los anticuerpos humanizados de la invención, las secuencias que codifican CDR de un anticuerpo de partida no humano definido en a) o b) se han injertado en los genes respectivos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas humanas.

Las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) de un anticuerpo monoclonal se entiende que son las secuencias de aminoácidos implicadas en la
20 unión específica al antígeno según Kabat et al., 1991, en conexión con Chothia y Lesk (1987). A partir de las secuencias de las regiones variables como se muestra en SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4, puede determinarse rutinariamente la secuencia CDR buscando en la base de datos de secuencias Kabat las características de la secuencia.

25 Las técnicas para obtener anticuerpos humanizados están disponibles rutinariamente para el experto en la técnica y se han descrito, *inter alia*, en EEUU 5.225.539; EEUU 6.548.640; y EEUU 6.982.321.

Los restos marco apropiados del anticuerpo injertado con CDR pueden revertirse a los restos murinos para mejorar la afinidad de unión. Como se ha descrito
30 anteriormente, a partir de los métodos pertinentes en la técnica, el experto sabe cómo obtener las CDR a partir de un anticuerpo no humano dado, elegir y obtener los genes de inmunoglobulina humanos apropiados, injertar las CDR en estos genes, modificar los restos marco seleccionados, expresar el anticuerpo injertado con CDR en células anfitrionas apropiadas, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) y
35 ensayar los anticuerpos recombinantes resultantes para determinar la afinidad y

especificidad de unión.

Para obtener un anticuerpo humanizado, los sitios de unión al antígeno, que están formados por las CDR de la cadena pesada y las CDR de la cadena ligera, se escinden del ADN de las células que secretan el anticuerpo monoclonal de roedor (murino) y se injertan en el ADN que codifica el marco del anticuerpo humano.

Alternativamente al injerto de CDR, se pueden humanizar anticuerpos anti-CD37 no humanos, en particular murinos, mediante la tecnología denominada "modificación en superficie", mediante la que los marcos de roedor no se cambian con la excepción de los restos expuestos en la superficie, como se describe en EEUU 5.639.641.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a anticuerpos humanizados que tienen una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:6 y una cadena ligera variable con una secuencia seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22.

En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos humanizados que tienen una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:8 y una cadena ligera variable con una secuencia seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22.

En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos humanizados que tienen una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:10 y una cadena ligera variable con una secuencia seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22.

Los anticuerpos humanizados definidos anteriormente se muestran en la Tabla 1.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo humanizado tiene una región constante de cadena pesada humana IgG1 y una región constante de cadena ligera kappa humana. Como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos quiméricos, las regiones constantes pueden seleccionarse de otras clases y subclases.

En determinadas realizaciones, en los anticuerpos humanizados de la invención, la cadena pesada constante humana IgG1 es una molécula de IgG1 con la secuencia mostrada en SEQ ID NO:24 o una molécula de IgG1 mutada obtenida de ésta y la región constante de la cadena ligera kappa humana que tiene la secuencia

mostrada en SEQ ID NO:26.

Las moléculas de anticuerpo anti-CD37 de la invención también pueden ser variantes de los anticuerpos que están definidos por las secuencias de aminoácidos mostradas en el listado de secuencias. Utilizando las tecnologías disponibles
5 rutinariamente, el experto en la técnica será capaz de preparar, ensayar y utilizar variantes funcionales de los anticuerpos definidos anteriormente. Los ejemplos son anticuerpos variantes con al menos una posición alterada en una CDR y/o marco, anticuerpos variantes con sustituciones de un único aminoácido en la región marco en la que hay una desviación de la secuencia de la línea germinal, anticuerpos con
10 sustituciones conservativas de aminoácidos, anticuerpos que están codificados por moléculas de ADN que hibridan, en condiciones astringentes, con las moléculas de ADN presentadas en el listado de secuencias que codifican las cadenas variables de anticuerpos.

Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales, pueden realizarse
15 sustituciones racionales para obtener variantes de anticuerpos que conservan la estructura molecular global del anticuerpo de partida. Las sustituciones de aminoácidos, es decir, las "sustituciones conservativas", pueden hacerse, por ejemplo, sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática del aminoácido respectivo. El experto está
20 familiarizado con las sustituciones de aminoácidos usualmente practicadas, que se describen, por ejemplo, en WO 2007/042309 y con los métodos para obtener anticuerpos así modificados. Dado el código genético y las técnicas de ADN recombinante y sintético, las moléculas de ADN que codifican anticuerpos variantes con uno o más intercambios conservativos de aminoácidos pueden diseñarse
25 rutinariamente y obtenerse fácilmente los anticuerpos respectivos.

En comparación con un anticuerpo definido por sus cadenas variables mostradas en el listado de secuencias, las variantes de anticuerpo englobadas por la invención tienen una identidad de secuencia en las regiones CDR de al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% ó 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y
30 lo más preferiblemente al menos 95%. Los anticuerpos preferidos también tienen una similitud de secuencia en las regiones CDR de al menos 80%, más preferiblemente 90% y lo más preferiblemente 95%. Las variantes preferidas de anticuerpos tienen una identidad de secuencia en las regiones variables de al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% u 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y lo
35 más preferiblemente al menos 95%. Los anticuerpos preferidos también tienen una

similitud de secuencia en las regiones variables de al menos 80%, más preferiblemente 90% y lo más preferiblemente 95%.

La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de polipéptidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. La "similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservativas de aminoácidos.

También puede obtenerse una variante usando un anticuerpo con una secuencia definida como se muestra en el listado de secuencias como punto de partida para optimizar y diversificar uno o más restos de aminoácidos, preferiblemente restos de aminoácidos en una o más CDR y cribando la colección resultante de variantes de anticuerpos con respecto a variantes con propiedades mejoradas. Se ha demostrado que es útil la diversificación de uno o más restos de aminoácidos en la CDR3 de la cadena ligera variable, CDR3 de la cadena pesada variable, CDR1 de la cadena ligera variable y/o CDR2 de la cadena pesada variable. La diversificación puede hacerse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, la tecnología denominada TRIM a la que se hace referencia en WO 2007/042309.

En una realización adicional, la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención es un anticuerpo de "afinidad madurada".

Un anticuerpo anti-CD37 de "afinidad madurada" es un anticuerpo anti-CD37 obtenido a partir de un anticuerpo con las secuencias mostradas en el listado de secuencias, que tiene una o más alteraciones en una o más CDR que resultan en una mejora de la afinidad para los antígenos comparada con el anticuerpo no madurado original respectivo. Uno de los procedimientos para generar dichos anticuerpos mutantes implica la expresión en fagos (Hawkins et al., 1992; y Lowman et al., 1991). Brevemente, se mutan varios sitios de regiones hipervariables (por ejemplo 6-7 sitios) para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos mutantes así generados se expresan de una manera monovalente en partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetados dentro de cada partícula. Los mutantes expresados por los fagos se criban entonces respecto a su actividad biológica (por ejemplo, la afinidad de unión) como se describe en la presente memoria.

Los anticuerpos de afinidad madurada también pueden producirse por métodos como describen, por ejemplo, Marks et al., 1992, (maduración de la afinidad barajando dominios de cadena pesada variables (VH) y cadena ligera variables (VL)) o Barbas et al., 1994; Shier et al., 1995; Yelton et al., 1995; Jackson et al., 1995; y Hawkins et al.,

1992 (mutagénesis aleatoria de restos CDR y/o marco). Los anticuerpos preferidos de afinidad madurada tendrán afinidades del orden nanomolar o incluso picomolar por el antígeno diana.

5 En una realización adicional, la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención es un anticuerpo "desinmunizado".

Un anticuerpo anti-CD37 "desinmunizado" es un anticuerpo obtenido a partir de un anticuerpo humanizado o quimérico con una secuencia mostrada en el listado de secuencias, que tiene una o más alteraciones en su secuencia de aminoácidos que resultan en una reducción de la inmunogenicidad del anticuerpo comparada con el anticuerpo no deshumanizado original respectivo. Uno de los procedimientos para 10 generar dichos anticuerpos mutantes implica la identificación y eliminación de epítomos de células T de la molécula de anticuerpo (Baker y Jones, 2007). En una primera etapa, puede determinarse la inmunogenicidad de la molécula de anticuerpo por varios métodos, por ejemplo, por la determinación *in vitro* de los epítomos de la célula T o la 15 predicción *in silico* de dichos epítomos, como se ha descrito en la bibliografía (Jones et al., 2004; Jones et al., 2005; Reche et al., 2004; Hertz et al., 2006). Una vez que se han identificado los restos críticos para la función de epítomo de la célula T pueden hacerse mutaciones para eliminar la inmunogenicidad y retener la actividad del anticuerpo (Jones et al., 2005; Tangri et al., 2005). Los métodos para introducir 20 mutaciones en proteínas son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por técnicas de PCR con superposición.

Como la región Fc de un anticuerpo interacciona con varios receptores de Fc, que resulta en varias capacidades funcionales importantes (que se refieren como "funciones efectoras"), el anticuerpo, en determinadas realizaciones, es un anticuerpo 25 de longitud completa o un anticuerpo que contiene una parte de la región Fc, esto último siempre que el anticuerpo exhiba una unión específica tanto a la parte relevante del antígeno como a los receptores de Fc. La elección del tipo y longitud de la región constante depende de que sean características deseables las funciones efectoras como la fijación de complemento o la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo y de las propiedades farmacológicas deseadas de la proteína de 30 anticuerpo.

En una realización de la invención, el anticuerpo anti-CD37 es un anticuerpo quimérico o humanizado con una región Fc, o la sección relevante de ésta, que se ha modificado por ingeniería para modular las funciones efectoras, en particular para 35 incrementar la unión del anticuerpo a uno o más receptores de Fc, incrementando de

122
12

esta manera la función efectora ADDC. La modificación por ingeniería de la región Fc media la función efectora del anticuerpo en presencia de células efectoras más eficazmente que la del anticuerpo parental con Fc no modificada por ingeniería. En una realización, dicha variante de anticuerpo media ADCC que es mayor que la
5 mediada por el anticuerpo parental. (En el texto que sigue, a no ser que se indique otra cosa, el término "parental" en el contexto de una molécula de anticuerpo, o en el contexto de IgG o la región Fc, se refiere a la molécula de anticuerpo, región Fc o IgG no modificada por ingeniería, respectivamente, a partir de la que se obtiene la molécula mutada (modificada por ingeniería)).

10 Se han sugerido en la técnica varias modificaciones de la región Fc, tanto en la bibliografía científica como en los documentos de patentes, por ejemplo en EP 0307434, WO 9304173, WO 9734631, WO 9744362, WO 9805787, WO 9943713, WO 9951642, WO 9958572, WO 02060919, WO 03074679, WO 2004016750, WO 2004029207, WO 2004063351, WO 2004074455, WO 2004035752,
15 WO 2004099249, WO 2005077981, WO 2005092925, WO 2006019447, WO 2006031994, WO 2006047350, WO 2006053301, WO 2006088494 y WO 2007041635.

20 En las realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención son variantes de Fc con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 332 y/o 239 y/o 236. En las realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención tienen mutaciones en el dominio Fc seleccionadas del grupo de

- i) una única sustitución en la posición 332, preferiblemente I332E;
- 25 ii) una combinación de sustituciones en las posiciones 239 y 332, preferiblemente S239D/I332E;
- iii) una combinación de sustituciones en las posiciones 236 y 332, preferiblemente G236A/I332E;
- iv) una combinación de sustituciones en las posiciones 236, 239 y 332, preferiblemente G236A/S239D/I332E.

30 Las sustituciones definidas anteriormente han sido descritas, por ejemplo, por Lazar et al., 2006, en WO 2004029207 y WO 2007041635.

Las variantes de Fc en los anticuerpos de la presente invención se definen según las modificaciones de aminoácidos que las componen. Así, por ejemplo, I332E es una variante de Fc con la sustitución I332E respecto al polipéptido Fc parental. De
35 la misma manera, S239D/I332E define una variante de Fc con las sustituciones S239D y I332E y S239D/I332E/G236A define una variante de Fc con las sustituciones S239D,

I332E y G236A respecto al polipéptido Fc parental.

La numeración es según el esquema de numeración de EU (Kabat et al., 1991), que se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969). El experto en la técnica apreciará que estas convenciones consisten en la numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, lo que permite una referencia normalizada a las posiciones conservadas en las familias de inmunoglobulinas.

En los anticuerpos definidos anteriormente, las posiciones sustituidas 236, 239 y 332 corresponden a las posiciones 119, 122 y 215, respectivamente, de la cadena pesada de IgG1 mostrada en SEQ ID NO:24. (En las secuencias de longitud completa de las cadenas pesadas de los anticuerpos A2, A4, B2 y B4 mostradas en SEQ ID NOs: 28, 32, 36 y 40, los aminoácidos sustituidos están en las posiciones 235, 238 y 331).

En determinadas realizaciones, las variantes de Fc de la invención están basadas en secuencias de IgG humanas y así se utilizan secuencias de IgG humanas como las secuencias "base" frente a las que se comparan otras secuencias. Para los anticuerpos de la presente invención, la región Fc modificada por ingeniería es preferiblemente IgG, en particular IgG1, pero puede ser también IgG2 o secuencias variantes de otras clases de inmunoglobulinas tales como IgA, IgE, IgD, IgM o versiones quiméricas de dos o más clases de inmunoglobulinas (por ejemplo, IgG2/IgG1) y semejantes. Aunque las variantes de Fc de la presente invención se modifican por ingeniería en el contexto de una IgG parental, las variantes pueden modificarse por ingeniería en o "transferirse" al contexto de otra segunda IgG parental. Esto se hace determinando los restos y sustituciones "equivalentes" o "correspondientes" entre la primera y segunda IgG, típicamente tomando como base la homología de secuencia o estructural entre las secuencias de la primera y segunda IgG. Con el fin de establecer la homología, la secuencia de aminoácidos de una primera IgG indicada en la presente memoria se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias, utilizando uno o más de los programas de alineamiento de homología conocidos en la técnica, permitiendo las inserciones y deleciones necesarias con el fin de mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de restos conservados por deleción e inserción arbitraria), se definen los restos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la primera variante de Fc. Independientemente de cómo se determinan los restos equivalentes o correspondientes e independientemente de la

identidad de la IgG parental en la que se hacen las IgG, lo que se pretende expresar es que las variantes de Fc utilizadas en la presente invención pueden modificarse por ingeniería en cualquier segunda IgG parental que tiene una homología de secuencia o estructural significativa con la variante de Fc. Así, por ejemplo, si se genera una variante de anticuerpo en la que el anticuerpo parental es IgG1 humana, utilizando los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar los restos equivalentes, la variante del anticuerpo puede modificarse por ingeniería, por ejemplo, en un anticuerpo IgG2 parental humano, un anticuerpo IgA parental humano (véase WO 2007041635).

Los anticuerpos de la invención están dirigidos al antígeno CD37, lo que puede ser ventajoso respecto al direccionamiento de CD20 en enfermedades en las que el nivel de expresión de CD37 es mayor que el de CD20 como, por ejemplo, en leucemia linfocítica crónica, en la que las muestras han mostrado niveles altos de expresión del ARNm de CD37 comparados con el bajo nivel de expresión del ARNm de CD20.

Se ha mostrado que los anticuerpos de la invención son superiores al rituximab, un anticuerpo anti-CD20 registrado, respecto a la actividad ADCC en células Ramos, supresión de células B normales en sangre completa y supresión de células Ramos del linfoma de Burkitt. Como puede mostrarse en los experimentos de la invención, los anticuerpos de la invención (tanto los que tienen Fc no modificada por ingeniería como los que tienen Fc modificada por ingeniería) tienen una actividad supresora de células B que es superior a la del rituximab. Los anticuerpos con la región Fc mutada muestran un incremento de aproximadamente 10 veces en la actividad supresora de células B comparada con rituximab (Figura 11B).

Los representantes de los anticuerpos de CD37 de la invención muestran una actividad pro-apoptótica potente sin entrecruzamiento; a este respecto, los anticuerpos con esta propiedad son superiores al anti-CD37 SMIP Tru16.4, que no muestra apoptosis sin entrecruzamiento (Zhao et al., 2007). La inducción de la apoptosis sin entrecruzamiento, que puede mostrarse para los anticuerpos de la invención tanto con como sin modificación por ingeniería de Fc, es ventajosa en ausencia de un agente de entrecruzamiento in vivo (por ejemplo, células efectoras que poseen receptores Fcγ) o a una densidad baja del antígeno diana CD37 (por ejemplo, células tumorales con un bajo nivel de expresión de CD37). Un anticuerpo que induce la apoptosis sin entrecruzamiento puede aún causar la muerte celular, mientras que un anticuerpo dependiente de entrecruzamiento no puede.

En un aspecto adicional, una molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención

es un fragmento de anticuerpo que se obtiene a partir de un anticuerpo específico CD37 humanizado o quimérico según la presente invención. Para obtener fragmentos de anticuerpo, por ejemplo fragmentos Fab, la digestión puede conseguirse por medio de técnicas rutinarias, por ejemplo usando papaína. En WO 94/29348 y
5 EEUU 4.342.566 se describen ejemplos de digestión con papaína. La digestión con papaína de anticuerpos produce típicamente dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina da lugar a un
10 fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y es todavía capaz de entrecruzar el antígeno.

Los fragmentos Fab obtenidos por digestión del anticuerpo también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH_1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que contienen restos adicionales en el extremo carboxi del dominio CH_1 de la cadena pesada que
15 incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En la presente memoria, Fab'-SH es la designación de Fab' en el que el o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Los fragmentos de anticuerpos también pueden generarse por
20 métodos de biología molecular que producen los respectivos fragmentos de ADN codificadores.

La molécula de anticuerpo será típicamente un tetrámero que consiste en dos pares cadena ligera/cadena pesada, pero también puede ser dimérico, es decir
25 consiste en un par cadena ligera/cadena pesada, por ejemplo un fragmento Fab o Fv, o puede ser un anticuerpo monomérico de una única cadena (scFv; Johnson y Bird, 1991), un fragmento monovalente o un fragmento divalente.

La molécula de anticuerpo anti-CD37 también puede estar en la forma de un conjugado, es decir, una molécula de anticuerpo que está acoplada químicamente a un agente citotóxico, particularmente a un agente citotóxico que induce citotoxicidad
30 (por ejemplo, apoptosis o parada mitótica) de células tumorales. Como resultado de los mecanismos normales de aclaramiento farmacológico, un anticuerpo empleado en un conjugado de fármaco (un "inmunoconjugado") contacta y se une a las células diana sólo en cantidades limitadas. Por lo tanto, el agente citotóxico empleado en el conjugado debe ser altamente citotóxico de manera que se produce una muerte
35 celular suficiente para incitar un efecto terapéutico. Como se describe en EEUU

13
1424

2004/0241174, los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen taxanos (véanse, por ejemplo, WO 01/38318 y WO 03/097625), agentes alquilantes de ADN (por ejemplo, análogos de CC-1065), antraciclinas, análogos de tubulisina, análogos de duocarmicina, doxorubicina, auristatina E, toxina ricina A y agentes citotóxicos que
5 comprenden un resto de polietilen glicol reactivo (véanse, por ejemplo, Sasse et al., 2000; Suzawa et al., 2000; Ichimura et al., 1991; Francisco et al., 2003; EEUU 5.475.092; EEUU 6.340.701; EEUU 6.372.738; y EEUU 6.436.931; EEUU 2001/0036923; EEUU 2004/0001838; EEUU 2003/0199519; y WO 01/49698).

En una realización preferida, el agente citotóxico es un maitansinoide, es decir,
10 un derivado de maitansina (CAS 35846538), sabiéndose en la técnica que los maitansinoides incluyen maitansina, maitansinol, ésteres C-3 del maitansinol y otros análogos y derivados del maitansinol (véanse, por ejemplo, EEUU 5.208.020 y EEUU 6.441.163).

Los inmunoconjugados del anticuerpo anti-CD37 pueden diseñarse y
15 sintetizarse como se describe en WO2007/077173 para los inmunoconjugados anti-FAP.

En una realización adicional, la molécula anti-CD37 de la invención puede marcarse radiactivamente para formar un radioinmunoconjugado, un método sugerido para el anticuerpo anti-CD37 MB-1 (Buchsbaum et al., 1992, véase más arriba). Los
20 radionúclidos con propiedades de radiación ventajosas se conocen en la técnica, los ejemplos son Fósforo-32, Estroncio-89, Itrio-90, Yodo-131, Samario-153, Erblio-169, Iterbio-175, Renio-188, que se han acoplado a MAb de forma exitosa y estable. Las moléculas de anticuerpo anti-CD37 de la invención pueden marcarse con varios radionúclidos utilizando métodos de marcaje directo o marcaje indirecto conocidos en
25 la técnica, como se describe en EEUU 6.241.961. Una revisión de las tecnologías para generar y aplicar nuevos conjugados de anticuerpo marcados radiactivamente que son útiles en la presente invención la proporcionan Goldenberg y Sharkey, 2007.

Una molécula de anticuerpo de la invención, tanto si tiene Fc modificada por ingeniería como si no, también puede ser biespecífica, es decir, una molécula de
30 anticuerpo que se une a dos dianas diferentes, siendo una de ellas CD37 y seleccionándose la otra, por ejemplo, de antígenos de superficie expresados por las células T, por ejemplo, CD3, CD16 y CD56.

La presente invención también se refiere a moléculas de ADN que codifican las moléculas de anticuerpo anti-CD37 quiméricas o humanizadas de la invención. Las
35 secuencias que codifican las cadenas pesadas variables de las moléculas de

anticuerpo de la invención se muestran en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:9. Las secuencias que codifican las cadenas ligeras variables de las moléculas de anticuerpo de la invención se muestran en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO: 21.

5 Las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y la cadena pesada pueden sintetizarse químicamente y enzimáticamente (amplificación por PCR) por métodos estándar. En primer lugar, los oligonucleótidos adecuados pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Gait, 1984), que pueden utilizarse para producir un gen sintético. Los métodos para generar genes
10 sintéticos a partir de oligonucleótidos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Stemmer et al., 1995; Ye et al., 1992; Hayden y Mandecki, 1988; Frank et al., 1987).

Las moléculas de ADN de la invención incluyen, pero no están limitadas a, las moléculas de ADN mostradas en el listado de secuencias. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que hibridan con
15 las moléculas de ADN mostradas en el listado de secuencias en condiciones de unión y de lavado altamente astringentes, como se define en WO 2007/042309, en el que dichas moléculas de ácido nucleico codifican un anticuerpo o un fragmento funcional de éste que tiene propiedades equivalentes o superiores a un anticuerpo codificado por una secuencia mostrada en el listado de secuencias. Las moléculas preferidas
20 (desde una perspectiva del ARNm) son las que tienen al menos 75% u 80% (preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%) de homología o identidad de secuencia con una de las moléculas de ADN descritas en la presente memoria.

Otra clase más de variantes de ADN que están dentro del alcance de la
25 invención pueden definirse con referencia al polipéptido que codifican. Estas moléculas de ADN se desvían respecto a su secuencia de las mostradas en el listado de secuencias pero codifican, debido a la degeneración del código genético, anticuerpos con secuencias de aminoácidos idénticas. Como ejemplo, con el fin de expresar los anticuerpos en células eucariotas, las secuencias de ADN mostradas en
30 el listado de secuencias, se han diseñado para que se correspondan con la utilización de codones en las células eucariotas. Si se desea expresar los anticuerpos en *E. coli*, estas secuencias pueden cambiarse para que se correspondan con la utilización de codones de *E. coli*. Las variantes de moléculas de ADN de la invención pueden construirse de varias formas diferentes, como se describe, por ejemplo, en
35 WO 2007/042309.

15
25

Para producir las moléculas de anticuerpos anti-CD37 recombinantes de la invención, las moléculas de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa o fragmentos de éstas se insertan en un vector de expresión de manera que las secuencias se unan operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción.

Para fabricar los anticuerpos de la invención, el experto en la técnica puede elegir de una gran variedad de sistemas de expresión muy conocidos en la técnica, por ejemplo, los revisados por Kipriyanow y Le Gall, 2004.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, episomas derivados de EBV, y semejantes. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula anfitriona. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados. En ciertas realizaciones, ambas secuencias de ADN se insertan en el mismo vector de expresión. Los vectores convenientes son los que codifican una secuencia de inmunoglobulina humana funcionalmente completa CH o CL, con sitios de restricción apropiados diseñados por ingeniería genética para que cualquier secuencia de VH o VL pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se ha descrito anteriormente. La cadena constante es usualmente kappa o lambda para la cadena ligera del anticuerpo, y para la cadena pesada puede ser, sin limitación, cualquier isotipo de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) u otras inmunoglobulinas, incluyendo las variantes alélicas.

El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo desde una célula anfitriona. El ADN que codifica la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal esté unido al extremo amino del ADN de la cadena del anticuerpo maduro. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido heterólogo de una proteína que no sea una inmunoglobulina. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la cadena del anticuerpo ya puede contener una secuencia del péptido señal.

Además de las secuencias de ADN que codifican las cadenas del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes llevan secuencias reguladoras que incluyen promotores, amplificadores, señales de terminación y de poliadenilación y otros elementos de control de la expresión que controlan la expresión de las cadenas del anticuerpo en una célula anfitriona. Los ejemplos de secuencias de promotores (ejemplificados para la expresión en células de mamíferos) son promotores y/o

amplificadores derivados de (CMV) (tal como CMV del virus Simian 40 (SV40) (tal como el promotor/amplificador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), promotores derivados de poliomias y promotores fuertes de mamíferos tales como promotores nativos de inmunoglobulinas y actinas.

- 5 Los ejemplos de señales de poliadenilación son BGH poliA, poliA SV40 tardío o temprano; alternatively, pueden usarse 3'UTR de genes de inmunoglobulinas etc.

Los vectores de expresión recombinantes también pueden llevar secuencias que regulen la replicación del vector en las células anfitrionas (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. Las moléculas de ácido nucleico
10 que codifican la cadena pesada o una parte de unión al antígeno de ésta y/o la cadena ligera o una parte de unión al antígeno de ésta de un anticuerpo anti-CD37 y los vectores que comprenden estas moléculas de ADN pueden introducirse en células anfitrionas, por ejemplo células bacterianas o células eucariotas superiores, por ejemplo células de mamíferos, según métodos de transfección muy conocidos en la
15 técnica, que incluyen transfección mediada por liposomas, transfección mediada por policationes, fusión de protoplastos, microinyecciones, precipitación con fosfato de calcio, electroporación o transferencia mediante vectores virales.

Preferiblemente, las moléculas de ADN que codifican la cadena pesada y la cadena ligera están presentes en dos vectores que se co-transfectan en la célula
20 anfitriona, preferiblemente una célula de mamíferos.

Las líneas de células de mamíferos disponibles como anfitriones para llevar a cabo la expresión son muy conocidas en la técnica e incluyen, inter alia, células de ovario de hámster chino (CHO, CHO-DG44), NSO, células SP2/0, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de
25 carcinoma humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, células 3T3 o los derivados/progenies de cualquiera de dichas líneas celulares. Pueden usarse otras células de mamíferos, que incluyen pero no se limitan a, líneas celulares de ser humano, ratones, ratas, monos y roedores, u otras células eucariotas, que incluyen pero no se limitan a, células de levadura, insectos y plantas, o células procariotas tales
30 como las bacterias. Las moléculas de anticuerpo anti-CD37 de la invención se producen cultivando las células anfitrionas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de la molécula de anticuerpo en las células anfitrionas.

Las moléculas de anticuerpos se recuperan preferiblemente del medio de cultivo como un polipéptido secretado o pueden recuperarse de lisados de células
35 anfitrionas si, por ejemplo, se expresan sin una señal secretora. Es necesario purificar

- las moléculas del anticuerpo usando métodos estándar de purificación de proteínas usados para proteínas recombinantes y proteínas de células anfitrionas de manera que se obtengan preparaciones sustancialmente homogéneas del anticuerpo. Como ejemplo, los métodos de purificación de última generación útiles para obtener la
- 5 molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención incluyen, como una primera etapa, la separación de las células y/o de los restos celulares en forma de partículas del medio de cultivo o del lisado. A continuación, el anticuerpo se purifica de las proteínas, polipéptidos y ácidos nucleicos contaminantes solubles, por ejemplo, por fraccionamiento en columnas de inmutafinidad o de intercambio de iones,
- 10 precipitación en etanol, HPLC en fase reversa, cromatografía en Sefadex, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio de cationes. Como etapa final del proceso para obtener una preparación de molécula de anticuerpo anti-CD37, la molécula de anticuerpo purificada puede secarse, por ejemplo liofilizarse, como se describe más adelante para las aplicaciones terapéuticas.
- 15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene, como ingrediente activo, la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención.

Para ser usado en terapia, el anticuerpo anti-CD37 se incluye en composiciones farmacéuticas apropiadas para facilitar la administración a animales o a

20 seres humanos. Pueden prepararse formulaciones típicas de la molécula de anticuerpo anti-CD37 mezclando la molécula de anticuerpo anti-CD37 con vehículos, excipientes o agentes estabilizantes aceptables fisiológicamente, en forma de formulaciones liofilizadas o secadas de cualquier otra forma o disoluciones acuosas o suspensiones acuosas o no acuosas. Los vehículos, excipientes, agentes

25 modificadores o agentes estabilizantes no son tóxicos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Incluyen sistemas tamponadores tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos o inorgánicos y sus sales; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; agentes conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio,

30 cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil-parabenes tales como metil o propil-paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinil-pirrolidona o polietilen glicol (PEG); aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos,

35 disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen

glucosa, manosa, sacarosa, trehalosa, dextrinas o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares alcoholes tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos iónicos o no iónicos tales como TWEEN™ (polisorbatos),
5 PLURONICS™ o ésteres de ácidos grasos, éteres de ácidos grasos o ésteres de azúcares. En la formulación del anticuerpo también pueden estar contenidos disolventes orgánicos tales como etanol o isopropanol. Los excipientes también pueden tener una función modificadora de la liberación o modificadora de la absorción.

Las moléculas del anticuerpo anti-CD37 también pueden secarse (por
10 liofilización, atomización, liofilización por pulverización, secarse mediante gases supercríticos o casi supercríticos, secarse en vacío o secarse con aire), precipitarse o cristalizarse o incluirse en microcápsulas que se preparan, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial usando, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o gelatina y poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en
15 sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), en macroemulsiones o precipitarse o inmovilizarse sobre vehículos o superficies, por ejemplo mediante la tecnología pcmc (microcristales revestidos con proteínas). Dichas técnicas se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21
20 edición, Hendrickson R. Ed.

Naturalmente, las formulaciones para ser usadas para la administración in vivo tienen que ser estériles; la esterilización puede conseguirse mediante técnicas convencionales, por ejemplo por filtración a través de membranas de filtración estériles.

25 Puede ser útil aumentar la concentración del anticuerpo anti-CD37 para llegar a una formulación líquida denominada de alta concentración (HCLF); para generar dichas HCLF se han descrito varias formas.

La molécula de anticuerpo anti-CD37 también puede estar contenida en una preparación de liberación sostenida. Dichas preparaciones incluyen matrices sólidas, semisólidas o líquidas de polímeros hidrofóbicos o hidrofílicos y pueden estar en forma
30 de artículos conformados, por ejemplo, películas, barras o microcápsulas y pueden aplicarse mediante un dispositivo de aplicación. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o acetato butirato de sacarosa), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas
35 (EEUU 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y y etil-L-glutamato, copolímeros

no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y a posibles cambios en la inmunogenicidad. Dependiendo del mecanismo implicado pueden idearse estrategias racionales para la estabilización. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares por medio del intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilización (como, por ejemplo, se describe en WO 89/011297) en disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

En EEUU 7.060.268 y EEUU 6.991.790 se describen formulaciones que también pueden usarse para la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención.

La molécula de anticuerpo CD37 también puede incorporarse en otras formas de aplicación, tales como dispersiones, suspensiones o liposomas, comprimidos, cápsulas, polvos, pulverizadores, parches o cremas transdérmicas o intradérmicas con o sin dispositivos que potencien la permeación, obleas, formulaciones nasales, bucales o pulmonares, o pueden producirse mediante células implantadas o – después de terapia génica – mediante las propias células del individuo.

Una molécula de anticuerpo anti-CD37 también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la semivida en el suero o para aumentar la unión a los tejidos.

El modo preferido de aplicación es parenteral, por infusión o inyección (intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica), pero también pueden ser aplicables otros modos de aplicación tales como por inhalación, transdérmico, intranasal, bucal u oral.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, de la

gravedad y del curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico que atiende. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de
5 tratamientos.

Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, una dosificación candidata inicial para administrar al paciente es aproximadamente 0,01 µg/kg a 40 mg/kg (por ejemplo, 0,1 - 20 mg/kg) de anticuerpo, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Para administraciones
10 repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se sostiene hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se evalúa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales, por ejemplo, determinando el grado de supresión de las células B (por ejemplo,
15 utilizando citometría de flujo).

La "cantidad eficaz terapéuticamente" del anticuerpo a ser administrada es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno.

La molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención y las composiciones farmacéuticas que la contienen son útiles para suprimir células B que expresan CD37
20 en su superficie y que causan una enfermedad cancerosa o autoinmune/inflamatoria.

En un primer aspecto, la composición farmacéutica de la invención es útil para el tratamiento de cánceres, en particular de cualquier malignidad CD37 positiva.

Las malignidades de las células B incluyen, sin limitación, linfomas de células B (por ejemplo, varias formas de la enfermedad de Hodgkin, linfoma de células B no-
25 Hodgkin (NHL) y linfomas relacionados (por ejemplo, macroglobulinemia de Waldenström (también denominada linfoma linfoplasmacítico o inmunocitoma) o linfomas del sistema nervioso central), leucemias (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL; también denominada leucemia linfocítica crónica de células B BCLL), leucemia de células vellosas y leucemia
30 mioblástica crónica) y mielomas (por ejemplo, mieloma múltiple). Las malignidades de las células B adicionales incluyen linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma múltiple, plasmacitoma solitario del hueso, plasmacitoma extraóseo, linfoma de células B de la zona marginal extra-nodal del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT),
35 linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de células del

17
18 28

5 manto, linfoma de células B grandes difusas, linfoma de células B grandes del mediastino (tímico), linfoma intravascular de células B grandes, linfoma primario de cavidades, linfoma/leucemia de Burkitt, linfoma de la zona gris, proliferaciones de células B con un potencial maligno indeterminado, granulomatosis linfomatoide y trastorno linfoproliferativo posterior a trasplantes.

En un aspecto adicional, una composición farmacéutica que contiene anticuerpos anti-CD37 es útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias que implican células B en su patología.

10 Dichas enfermedades incluyen, pero no están limitadas a: artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, policondritis, artritis psoriásica, psoriasis, dermatitis, polimiositis/dermatomiositis, miositis de cuerpos de inclusión, miositis inflamatoria, necrosis epidérmica tóxica, escleroderma y esclerosis sistémico, síndrome de CREST, respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria del
15 intestino delgado, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de distrés respiratorio, síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS), meningitis, encefalitis, uveitis, colitis, glomerulonefritis, condiciones alérgicas, eccema, asma, condiciones que implican infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmune, deficiencia en la adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus discoide,
20 lupus mielitis, lupus cerebritis, diabetes juvenil, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica, neuromielitis óptica, fiebre reumática, corea de Sydenham, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis de Wegener y enfermedad de Churg-Strauss, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo
25 vasculitis/angiitis por hipersensibilidad, ANCA y vasculitis reumatoide), anemia aplásica, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmune incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, aplasia de células rojas pura (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, trastornos
30 inflamatorios del sistema nervioso central (CNS), síndrome de daño orgánico múltiple, miastenia gravis, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad por anticuerpos anti-membrana basal glomerular, síndrome del anticuerpo anti-fosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de
35 Reynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo de

transplante de órganos sólidos, enfermedad de injerto frente a anfitrión (GVHD), penfigoide ampolloso, pénfigo, poliendocrinopatías autoinmunes, espondiloartropatías seronegativas, enfermedad de Reiter, síndrome de la persona rígida, arteritis de células gigantes, nefritis por complejo inmune, nefropatía IgA, polineuropatías IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), púrpura de Henoch-Schonlein, trombocitopenia autoinmune, enfermedad autoinmune de los testículos y ovarios incluyendo orquitis y ooforitis autoinmune, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunes incluyendo tiroiditis autoinmune, tiroiditis crónica (Tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes poliglandulares endocrinopáticos), diabetes de Tipo I también referida como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmune, neumonitis linfocitaria intersticial (HIV), bronquiolitis obliterante (no-transplante) vs NSIP, Síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos medios (incluyendo la enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), poliarteritis nodosa (PAN), espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger (nefropatía IgA), glomerulonefritis de progresión rápida, cirrosis biliar primaria, sprue celíaco (enteropatía por gluten), crioglobulinemia, crioglobulinemia asociada con hepatitis, esclerosis amiotrófica lateral (ALS), enfermedad arterial coronaria, fiebre Mediterránea familiar, poliangiitis microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott- Aldrich y tromboangiitis obliterante (véase WO 2007/014278).

Dependiendo del trastorno a ser tratado, la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención puede usarse por sí misma o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en particular seleccionados de agentes que dañan al ADN o agentes que se unen a la tubulina o de compuestos activos terapéuticamente que inhiben la angiogénesis, las rutas de transducción de señales o los puntos de control mitóticos en las células cancerosas.

El agente terapéutico adicional puede administrarse simultáneamente con, opcionalmente como un componente de la misma preparación farmacéutica, o antes o después de la administración de la molécula de anticuerpo anti-CD37.

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede ser, sin limitación, uno o más inhibidores seleccionados del grupo de inhibidores de la familia EGFR, familia VEGFR, IGF-1R, Receptores de la insulina, AuroraA, AuroraB, PLK y

19/05/2017

PI3 quinasa, FGFR, PDGFR, Raf, KSP o PDK1.

Los ejemplos adicionales de agentes terapéuticos adicionales son inhibidores de CDK, Akt, Src, Bcr-Abl, cKit, cMet/HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, antagonistas hedgehog, inhibidores de JAK/STAT, Mek, mTor, NFkappaB, el proteosoma, Rho, un
5 inhibidor de la señalización Wnt o señalización Notch o un inhibidor de la ruta de ubiquitinación.

Los ejemplos de inhibidores de Aurora son, sin limitación, PHA-739358, AZD-1152, AT-9283, CYC-116, R-763, VX-667, MLN-8045, PF-3814735, SNS-314, VX-689, GSK-1070916, TTP-607, PHA-680626, MLN-8237 y ENMD-2076.

10 Un ejemplo de un agente inhibidor de PLK es GSK-461364.

Los ejemplos de inhibidores de raf son BAY-73-4506 (también un inhibidor de VEGFR), PLX-4032, RAF-265 (también un inhibidor de VEGFR), sorafenib (también un inhibidor de VEGFR), XL-281 y Nevavar (también un inhibidor de VEGFR).

Los ejemplos de inhibidores de KSP son ispinesib, ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK-246053A, GSK-923295, MK-0731, SB-743921, LY-2523355 y
15 EMD-534085.

Los ejemplos de inhibidores de src y/o bcr-abl son dasatinib, AZD-0530, bosutinib, XL-228 (también un inhibidor de IGF-1R), nilotinib (también un inhibidor de PDGFR y cKit), imatinib (también un inhibidor de cKit), NS-187, KX2-391, AP-24534
20 (también un inhibidor de EGFR, FGFR, Tie2, Flt3), KM-80 y LS-104 (también un inhibidor de Flt3, Jak2).

Un ejemplo de un inhibidor de PDK1 es AR-12.

Un ejemplo de un inhibidor de Rho es BA-210.

Los ejemplos de inhibidores de la PI3 quinasa son PX-866, PX-867, BEZ-235
25 (también un inhibidor de mTor), XL-147 y XL-765 (también un inhibidor de mTor), BGT-226, CDC-0941.

Los ejemplos de inhibidores de cMet o HGF son XL-184 (también un inhibidor de VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (también un inhibidor de VEGFR), MGCD-265 (también un inhibidor de VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-
30 665752, AMG-102, AV-299, ARQ-197, MetMAb, CGEN-241, BMS-777607, JNJ-38877605, PF-4217903, SGX-126, CEP-17940, AMG-458, INCB-028060 y E-7050.

Un ejemplo de un inhibidor de c-Myc es CX-3543.

Los ejemplos de inhibidores de Flt3 son AC-220 (también un inhibidor de cKit y PDGFR), KW-2449, LS-104 (también un inhibidor de bcr-abl y Jak2), MC-2002, SB-
35 1317, lestaurtinib (también un inhibidor de VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348

(también un inhibidor de JAK2), XL-999 (también un inhibidor de cKit, FGFR, PDGFR y VEGFR), sunitinib (también un inhibidor de PDGFR, VEGFR y cKit) y tandutinib (también un inhibidor de PDGFR y cKit).

Los ejemplos de inhibidores de HSP90 son tanespimicina, alvespimicina, IPI-504, STA-9090, MEDI-561, AUY-922, CNF-2024 y SNX-5422.

Los ejemplos de inhibidores de JAK/STAT son CYT-997 (que también interacciona con la tubulina), TG-101348 (también un inhibidor de Flt3) y XL-019.

Los ejemplos de inhibidores de Mek son ARRY-142886, AS-703026, PD-325901, AZD-8330, ARRY-704, RDEA-119 y XL-518.

Los ejemplos de inhibidores de mTor son temsirolimus, deforolimus (que también actúa como un inhibidor de VEGF), everolimus (además un inhibidor de VEGF). XL-765 (también un inhibidor de la PI3 quinasa) y BEZ-235 (también un inhibidor de la PI3 quinasa).

Los ejemplos de inhibidores de Akt son perifosina, GSK-690693, RX-0201 y tricitiribina.

Los ejemplos de inhibidores de cKit son masitinib, OSI-930 (también actúa como un inhibidor de VEGFR), AC-220 (también un inhibidor de Flt3 y PDGFR), tandutinib (también un inhibidor de Flt3 y PDGFR), axitinib (también un inhibidor de VEGFR y PDGFR), sunitinib (también un inhibidor de Flt3, PDGFR, VEGFR) y XL-820 (también actúa como un inhibidor de VEGFR y PDGFR), imatinib (también un inhibidor de bcr-abl), nilotinib (también un inhibidor de bcr-abl y PDGFR).

Los ejemplos de antagonistas hedgehog son IPI-609, CUR-61414, GDC-0449, IPI-926 y XL-139.

Los ejemplos de inhibidores de CDK son seliciclib, AT-7519, P-276, ZK-CDK (también inhibe VEGFR2 y PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509, PHA-848125 y SCH-727965.

Los ejemplos de inhibidores de proteosomas son bortezomib, carfilzomib y NPI-0052 (también un inhibidor de NFkappaB).

Los ejemplos de inhibidores del proteosoma/inhibidores de la ruta NFkappaB son bortezomib, carfilzomib, NPI-0052, CEP-18770, MLN-2238, PR-047, PR-957, AVE-8680 y SPC-839.

Un ejemplo de un inhibidor de la ruta de ubiquitinación es HBX-41108.

Los ejemplos de agentes antiangiogénicos son inhibidores de FGFR, PDGFR y VEGF(R), y talidomidas, seleccionándose dichos agentes, sin limitación, de bevacizumab, motesanib, CDP-791, SU-14813, telatinib, KRN-951, ZK-CDK (también

un inhibidor de CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiDs, talidomida, CC-4047, lenalidomida, ENMD-0995, IMC-D11, Ki-23057, brivanib, cediranib, 1B3, CP-868596, IMC-3G3, R-1530 (también un inhibidor de Flt3), sunitinib (también un inhibidor de cKit y Flt3), axitinib (también un inhibidor de cKit), lestaurtinib (también un inhibidor de Flt3 y PKC), vatalanib, tandutinib (también un inhibidor de Flt3 y cKit), pazopanib, PF-337210, aflibercept, E-7080, CHIR-258, tosilato de sorafenib (también un inhibidor de Raf), vandetanib, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (también un inhibidor de EGFR y Her2), BAY-57-9352 (también un inhibidor de Raf), BAY-73-4506 (también un inhibidor de Raf), XL-880 (también un inhibidor de cMet), XL-647 (también un inhibidor de EGFR y EphB4), XL-820 (también un inhibidor de cKit), nilotinib (también un inhibidor de cKit y bcr-abl), CYT-116, PTC-299, BMS-584622, CEP-11981, dovitinib, CY-2401401 y ENMD-2976.

El agente terapéutico adicional también puede seleccionarse de inhibidores de EGFR, puede ser una molécula pequeña inhibidora de EGFR o un anticuerpo anti-EGFR. Los ejemplos de anticuerpos anti-EGFR, sin limitación, son cetuximab, panitumumab, nimotuzumab, zalutumumab; los ejemplos de moléculas pequeñas inhibidoras de EGFR son gefitinib, erlotinib y vandetanib (también un inhibidor de VEGFR). Otro ejemplo de un agente modulador de EGFR es la toxina de fusión EGF.

Los inhibidores adicionales de EGFR y/o Her2 útiles para combinarse con una molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención son lapatinib, trastuzumab, pertuzumab, XL-647, neratinib, BMS-599626 ARRY-334543, AV-412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (también un inhibidor de VEGFR), AZD-8931, ARRY-380 ARRY-333786, IMC-11F8, Zemab, TAK-285, AZD-4769.

El fármaco adicional también puede seleccionarse de agentes dirigidos a las rutas de señalización de IGF-1R y del receptor de la insulina. Dichos agentes incluyen anticuerpos que se unen a IGF-1R (por ejemplo, CP-751871, AMG-479, IMC-A12, MK-0646, AVE-1642, R-1507, BIIB-022, SCH-717454, rhu Mab IGF1R y entidades químicas nuevas dirigidas al dominio quinasa de IGF1-R (por ejemplo, OSI-906 o BMS-554417, XL-228, BMS-754807).

Otros agentes que pueden combinarse ventajosamente en una terapia con la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención son moléculas dirigidas a CD20, incluyendo anticuerpos específicos de CD20 como rituximab, LY-2469298, ocrelizumab, MEDI-552, IMMU-106, GA-101 (= R7159), XmAb-0367, ofatumumab, anticuerpos frente a CD20 marcados radiactivamente como tositumumab e ibritumomab tiuxetán u otras proteínas dirigidas a CD20 como SMIP Tru015, PRO-

131921, FBT-A05, veltuzumab, R-7159.

Los anticuerpos CD37 pueden combinarse con inhibidores de otros antígenos de superficie expresados en leucocitos, en particular anticuerpos o moléculas semejantes a anticuerpos, por ejemplo, anti-CD2 (siplizumab), anti-CD4
5 (zanolimumab), anti-CD19 (MT-103, MDX-1342, SAR-3419, XmAb-5574), anti-CD22 (epratuzumab), anti-CD23 (lumiliximab), anti-CD30 (iratumumab), anti-CD32B (MGA-321), anti-CD38 (HuMax-CD38), anti-CD40 (SGN40), anti-CD52 (alemtuzumab), anti-CD80 (galiximab). Un anticuerpo de la invención también puede combinarse con otro antagonista de CD37, por ejemplo, TRU-016.

10 Otros agentes que pueden combinarse con anticuerpos CD37 son inmunotoxinas como BL-22 (una inmunotoxina anti-CD22), inotuzumab ozogamicin (un conjugado anticuerpo anti-CD23-caliqueamicina), RFT5.dgA (cadena A de la toxina Ricina anti-CD25), SGN-35 (un conjugado anti-CD30-auristatina E) y gemtuzumab ozogamicina (un conjugado anti-CD33 caliqueamicina), MDX-1411 (conjugado anti-
15 CD70) o anticuerpos marcados radiactivamente como ⁹⁰I-epratuzumab (radioinmunoconjugado anti-CD22).

Además, los anticuerpos anti-CD37 pueden combinarse con agentes inmunomoduladores, por ejemplo, anticuerpos, que inducen apoptosis o modifican las rutas de transducción de las señales como los moduladores del receptor TRAIL
20 mapatumumab (un agonista del receptor TRAIL-1), lexatumumab (un agonista del receptor TRAIL-2), tigatuzumab, Apomab, AMG-951 y AMG-655; , un anticuerpo anti-HLA-DR (como 1D09C3), un anti-CD74, un inhibidor del ligando del factor de diferenciación de osteoclastos (como denosumab), un antagonista de BAFF (como AMG-623a) o un agonista de un receptor semejante a Toll (por ejemplo, TLR-4 o TLR-
25 9).

Otros fármacos que pueden utilizarse en combinación con las moléculas de anticuerpo anti-CD37 de la presente invención se seleccionan de, pero no se limitan a, hormonas, análogos de hormonas y antihormonas (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, fulvestrant, acetato de megestrol, flutamida, nilutamida,
30 bicalutamida, acetato de ciproterona, finasterida, acetato de buserelina, fludrocortisona, fluoximesterona, medroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesterona, dietilestilbestrol, propionato de testosterona, fluoximesterona/equivalentes, octreotida, arzoxifeno, pasireotida, vapreotida, adrenocorticosteroides/ antagonistas, prednisona, dexametasona, ainoglutetimida),
35 inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozol, letrozol, liarozol, exemestano,

21-20-31

atamestano, formestano), agonistas y antagonistas de LHRH (por ejemplo, acetato de goserelina, leuprolida, abarelix, cetrorelix, deslorelina, histrelina, triptorelina), antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos como metotrexato, trimetrexato, pemetrexed, análogos de pirimidina como 5-fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, capecitabina, 5 decitabina, nelarabina, 5-azacitidina y gemcitabina, análogos de purina y adenosina tales como mercaptopurina, tioguanina, azatioprina, cladribina y pentostatina, citarabina, fludarabina, clofarabina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas como doxorubicina, daunorubicina, epirubicina e idarrubicina, mitomicina-C, bleomicina dactinomycin, plicamicina, esplicamicina, actinomycin D, 10 mitoxantrona, mitoxantroneidarrubicina, pixantrona, estreptozocina, afidicolina); derivados del platino (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, lobaplatino, satraplatino); agentes alquilantes (por ejemplo, estramustina, semustina, mecloretamina, melfalán, clorambucilo, busulfán, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida, hidroxiurea, temozolomida, nitrosoureas tales como carmustina y 15 lomustina, tiotepa); agentes antimetabólicos (por ejemplo, alcaloides de la vinca como vinblastina, vindesina, vinorelbina, vinflunina y vincristina; y taxanos como paclitaxel, docetaxel y sus formulaciones, larotaxel, simotaxel, y epotilonas como ixabepilona, patupilona, ZK-EPO); inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas como etopósido y etopofos, teniposida, amsacrina, topotecán, irinotecán, 20 banoxantrona, camptotecina) y quimioterapéuticos misceláneos tales como derivados del ácido retinoico, amifostina, anagrelida, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interleuquina-2, procarbazona, N-metilhidrazina, mitotano y porfimer, bexaroteno, celecoxib, etilenmina/metil-melamina, trietilenmelamina, trietilen tiófosforamida, hexametilmelamina y enzimas L-asparaginasa, L-arginasa y 25 metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, RSU 1069, EO9, RB 6145, SR4233, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina, 5-yododesoxiuridina, bromodesoxicitidina, eritrohidroxinonil-adenina, antracendiona, GRN-163L (un antagonista competitivo del molde de telomerasa), SDX-101 (un agonista de PPAR), talabostat (un inhibidor de DPP), forodesina (un inhibidor de PNP), 30 atacicept (un receptor soluble dirigido a los miembros de la familia TNF BLyS y APRIL), agentes neutralizantes de TNF-alfa (Enbrel, Humira, Remicade), XL-844 (un inhibidor de CHK1/2), VNP-40101M (un agente alquilante de ADN), SPC-2996 (un inhibidor antisentido de bcl2), obatoclax (un inhibidor de bcl2), enzastaurin (un modulador de PKC beta), vorinostat (un inhibidor de HDAC), romidepsina (un inhibidor de HDAC), AT-101 (un inhibidor de Bcl-2/Bcl-xL), plitidepsina (un depsipéptido con 35

múltiples acciones), SL-11047 (un modulador del metabolismo de las poliaminas).

En determinadas realizaciones, la molécula de anticuerpo anti-CD37 se aplica junto con "CHOP" (una combinación de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona).

5 La molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención también puede utilizarse en combinación con otras terapias incluyendo cirugía, radioterapia, terapia endocrina, modificadores de la respuesta biológica, hipertermia y crioterapia y agentes para atenuar cualquier efecto adverso (por ejemplo, antieméticos), G-CSF, GM-CSF, fotosensibilizadores tales como derivados de hematoporfirina, Photofrin®, derivados
10 de benzoporfirina, Npe6, etioporfirina estaño, feoboride-una bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianinas de cinc.

Los anticuerpos monoclonales muestran una especificidad de antígeno exquisita y frecuentemente sólo reaccionan con el antígeno diana humano pero no con proteínas homólogas de especies animales. Para apoyar el desarrollo de anticuerpos
15 terapéuticos, son deseables modelos animales apropiados para evaluar la toxicidad y comportamiento farmacodinámico *in vivo*. Una posibilidad para un modelo *in vivo* es un ratón transgénico en el que el antígeno diana endógeno se reemplaza por su homólogo humano ("ratón knock-out/ knock-in"). En particular, para desarrollar anticuerpos anti-CD37 terapéuticos, el gen CD37 murino puede reemplazarse por el
20 gen CD37 humano. Esto puede conseguirse construyendo un vector de direccionamiento que contiene la secuencia genómica codificadora del gen CD37 humano flanqueada por secuencias que no se traducen. Este vector de direccionamiento puede utilizarse para recombinación homóloga utilizando células ES de ratón. Los animales transgénicos homocigotos para la expresión de CD37 humano
25 pueden utilizarse para evaluar el efecto farmacodinámico de anticuerpos dirigidos frente a CD37 humano, por ejemplo, evaluando el número de células B periféricas después de la aplicación de los anticuerpos. Alternativamente, estos ratones pueden utilizarse para investigar efectos tóxicos potenciales de anticuerpos específicos de CD37 humano después de una aplicación i.v.

30 Otra posibilidad en el caso en el que no exista reactividad cruzada animal de los anticuerpos monoclonales es la generación de un anticuerpo denominado sustituto. Un anticuerpo sustituto es un anticuerpo que reacciona con la proteína homóloga de una especie animal que es relevante y útil para la investigación de los efectos farmacodinámicos y tóxicos, por ejemplo, el ratón o el mono cinomolgus. En el caso de
35 CD37, se desarrollan anticuerpos monoclonales que son específicos para CD37 de macaco o CD37 de ratón, respectivamente. Idealmente, dicho anticuerpo sustituto

22
327

debería tener propiedades similares de unión y funcionales respecto al anticuerpo de desarrollo. Esto puede investigarse mediante la utilización de sistemas de ensayo que utilizan células que expresan CD37 de macaco o de ratón como células diana, por ejemplo, para unión, análisis de Scatchard por FACS, ensayos de ADCC y apoptosis.

5 Finalmente, el anticuerpo sustituto puede seleccionarse gracias a su actividad supresora de células B en sangre de macaco o de ratón in vitro.

Descripción Breve de las Figuras:

- 10 Fig. 1: El Anticuerpo Quimérico A0 reconoce específicamente el antígeno CD37, determinado por ensayo de competición por FACS
- Fig. 2: Unión de versiones humanizadas de A0 al antígeno CD37 celular, determinada por FACS
- Fig. 3: Unión de versiones humanizadas de A0 al antígeno CD37 celular, determinada por FACS
- 15 Fig. 4: Afinidad de versiones humanizadas de A0 por el antígeno CD37 celular, determinada por análisis de scatchard por FACS
- Fig. 5: Actividad ADCC de versiones humanizadas de A0 en células Ramos
- Fig. 6: Actividad pro-apoptótica de versiones humanizadas de A0 en células Ramos
- 20 Fig. 7: Actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0 en células Ramos
- Fig. 8: Actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb B0 en células Ramos
- 25 Fig. 9: Actividad pro-apoptótica de mAb A0 y B0
- Fig. 10: Actividad pro-apoptótica de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0
- Fig. 11 A: Supresión de células B humanas normales en un ensayo con sangre completa por anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería en comparación con Rituximab
- 30 Fig. 11 B: Actividad supresora de células B superior de los anticuerpos después de la modificación de Fc por ingeniería en comparación con Rituximab
- Fig. 11 C: Anticuerpos A2 y B2 no agotan células T y monocitos en ensayos con sangre completa
- 35 Fig. 12: Actividad ADCC superior después de la modificación de Fc por ingeniería comparada con Rituximab

- Fig. 13: Supresión de células Ramos del linfoma de Burkitt en un ensayo con sangre completa por anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería en comparación con Rituximab
- Fig. 14: Inhibición del crecimiento tumoral in vivo de tumores de xenoinjerto Ramos en ratones desnudos por anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería
- Fig. 15: Expresión de CD37 en células de mieloma múltiple
- Fig. 16: Actividad ADCC de los anticuerpos A2 y B2 en células de mieloma múltiple
- Fig. 17: Actividad pro-apoptótica de los anticuerpos A2 y B2 sobre células CLL derivadas de pacientes

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados

a) Generación del anticuerpo quimérico A0

Tomando como base las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera variable mostradas en SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4, se sintetizan las secuencias de ADN correspondientes aplicando la utilización de codones optimizada para las células de mamíferos (GeneArt, Regensburg, Alemania), añadiendo en el extremo 5' un sitio de clonación HindIII y en el extremo 3' un sitio de clonación BamHI. Las moléculas de ADN sintetizadas se digieren con HindIII y BamHI y los fragmentos de ADN resultantes (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3 más sitios de restricción) se clonan en vectores de expresión basados en pcADN3.1 que codifican la región constante de IgG1 humana y la región constante de la cadena ligera kappa humana, respectivamente (SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:26). Se preparan preparaciones de plásmidos EndoFree (Qiagen) y los plásmidos de la cadena pesada y ligera se co-transfectan en células freestyle HEK293 (Invitrogen) a una concentración de cada plásmido de 1 mg/L según el protocolo del proveedor. Después de 72 horas el sobrenadante se recoge y la concentración de IgG se determina mediante ELISA. El anticuerpo anti-CD37 quimérico resultante (designado A0) se purifica en una columna de proteína A modificada (GE Healthcare), se eluye en un tampón citrato y se dializa en PBS.

b) Generación de versiones humanizadas del anticuerpo quimérico A0

33

La humanización del mAb quimérico A0, como se obtiene en a), se realiza utilizando un método de injerto de CDR, como se describe, por ejemplo, en EEUU 5.225.539; EEUU 6.548.640; EEUU 6.982.321.

5 Para establecer un modelo estructural del dominio VL del mAb A0, se elige un molde estructural del Banco de Datos de Proteínas (PDB) del Brookhaven National Laboratory. El dominio VL de la entrada del anticuerpo monoclonal murino "1KB5" se elige con un 88% de identidad de secuencia / 81% de similitud y 2,5 Å de resolución. Para el dominio VH del mAb A0, se elige la misma estructura de anticuerpo monoclonal de ratón "1KB5" con 90% de identidad de secuencia y 91 % de similitud
10 como el molde principal de modelado. Se encuentra que el mejor ajuste para el marco de consenso humano es del tipo Vkappa1 humano (hVK1) y VH1 humano (hVH1). Como un diseño alternativo, se elige un injerto de los dominios consenso humanos más estables hVK3 y hVH3. Para el injerto, los modelos de los mAb A0_VL y mAb A0_VH se combinan con los modelos de los dominios consenso humanos hVK1,
15 hVK3, hVH1A y hVH3 y se combinan para producir modelos Fv. El injerto de bucles se realiza incluyendo las regiones CDR del mAb A0 murino en los marcos de anticuerpo humano y se sintetizan las moléculas de ADN de las construcciones de cadenas humanizadas.

20 Las regiones variables humanizadas respectivas se sintetizan y se clonan en vectores de expresión de inmunoglobulinas y se expresan de manera transitoria en el sistema de expresión HEK 293 freestyle (Invitrogen), como se describe en a), en las combinaciones de secuencias de cadenas pesadas y ligeras como se muestra en la Tabla 1 y se purifican en columnas de proteína A.

25 Tabla 1
Secuencias de cadenas pesadas y ligeras variables de los anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados utilizados en los Ejemplos.

Anticuerpo	Cadena Pesada SEQ ID NO: aa/ADN	Cadena Ligera SEQ ID NO: aa/ADN
A (=A0)	seq 2/1	seq 4/3
B	seq 6/5	seq 12/11
C	seq 6/5	seq 14/13
D	seq 6/5	seq 16/15
H	seq 8/7	seq 18/17
I	seq 8/7	seq 20/19

J	seq 8/7	seq 22/21
K	seq 10/9	seq 18/17
L	seq 10/9	seq 20/19
M	seq 10/9	seq 22/21

c) Generación de anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados con Fc modificada por ingeniería

5 La generación de mutantes de Fc se realiza como describen Lazar et al., 2006. La secuencia de cadena pesada con Fc modificada por ingeniería resultante se introduce en el vector de expresión pAD-CMV1 (descrito en EP 393 438) y se co-transfecta junto con un plásmido que contiene la secuencia codificadora de la cadena ligera en células CHO-DG44. El anticuerpo se recoge del medio de cultivo celular 5 a 7 días después de la transfección y se purifica mediante cromatografía en proteína A, se eluye en un tampón citrato y se dializa en PBS. El contenido proteico de las muestras se determina mediante Proteína A HPLC, el contenido en endotoxinas se determina mediante Kinetic-QCL Kinetic Chromogenic Assay (Lonza). El contenido en monómero de las muestras se determina mediante HP-SEC, todas las muestras utilizadas para el ensayo funcional muestran un contenido en monómero > 95%.

Tabla 2

20 Secuencias de cadenas pesadas y ligeras variables (columnas III y IV) y mutaciones en Fc (columna II) de los anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados (el anticuerpo A0, B0, C0 etc. es idéntico al anticuerpo A y B, C etc. de la Tabla 1).

25 (Las secuencias en la columna V marcadas con * se refieren a la secuencia de IgG1 de las SEQ ID N°s 24 y 23 (secuencias de tipo salvaje) que han sido modificadas para que tengan la o las sustituciones correspondientes a la columna II, y la o las respectivas mutaciones en el ADN codificante).

24
#24

Ab	Sustitución/sustituciones en Fc (numeración de Kabat)	SEQ ID NO: cadena pesada v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena pesada completa aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera completa aa/ADN
A0	-	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fusionada a 24/23	4/3 fusionada a 26/25
A1	I332E	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fusionada a 24*/23*	4/3 fusionada a 26*/25*
A2	S239D/I332E	seq 2/1	seq 4/3	28/27	30/29
A3	I332E/G236A	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fusionada a 24*/23*	4/3 fusionada a 26/25
A4	S239D/I332E/G236A	seq 2/1	seq 4/3	32/31	34/33
B0	-	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fusionada a 24/23	12/11 fusionada a 26/25
B1	I332E	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fusionada a 24*/23*	12/11 fusionada a 26/25
B2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 12/11	36/35	38/37
B3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fusionada a 24*/23*	12/11 fusionada a 26/25
B4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 12/11	40/39	42/41
C0	-	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24/23	14/13 fusionada a 26/25
C1	I332E	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
C2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
C3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
C4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
D0	-	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24/23	16/15 fusionada a 26/25
D1	I332E	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25
D2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25

Ab	Sustitución/sustituciones en Fc (numeración de Kabat)	SEQ ID NO: cadena pesada v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena pesada completa aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera completa aa/ADN
D3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25
D4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25
H0	-	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24/23	18/17 fusionada a 26/25
H1	I332E	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
H2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
H3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
H4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
I-0	-	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24/23	20/19 fusionada a 26/25
I-1	I332E	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
I-2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
I-3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
I-4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
J0	-	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24/23	22/21 fusionada a 26/25
J1	I332E	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
J2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
J3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a	22/21 fusionada a

235
21

Ab	Sustitución/sustituciones en Fc (numeración de Kabat)	SEQ ID NO: cadena pesada v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena pesada completa aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera completa aa/ADN
				24*/23*	26/25
J4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
K0	-	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24/23	18/17 fusionada a 26/25
K1	I332E	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
K2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
K3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
K4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
L0	-	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24/23	20/19 fusionada a 26/25
L1	I332E	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
L2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
L3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
L4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
M0	-	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24/23	22/21 fusionada a 26/25
M1	I332E	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
M2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
M3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25

Ab	Sustitución/sustituciones en Fc (numeración de Kabat)	SEQ ID NO: cadena pesada v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena pesada completa aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera completa aa/ADN
M4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25

Ejemplo 2

El mAb quimérico A0 reconoce específicamente el antígeno CD37

5 La especificidad del MAb A0 para CD37 celular se ensaya en un ensayo de competición por FACS en células Ramos de linfoma de Burkitt (ATCC #CRL-1596). Las células se crecen en frascos de cultivo de tejidos (175 cm²) utilizando RPMI-1640 + GlutaMAX suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 12,5

10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 1% de MEM aminoácidos no esenciales como medio de cultivo. Las células se cultivan con una densidad inicial de 3x10⁵ células/ml a 37°C y 5% CO₂ en una atmósfera humidificada durante tres días. Los cultivos se mantienen a una concentración celular entre 3x10⁵ y 1,8x10⁶/ml por sub-cultivo en una

15 proporción 1:6 con medio de cultivo fresco 2-3 veces por semana. Para el análisis de competición por FACS, se utiliza el mAb HH1 específico de CD37 (Santa Cruz) marcado directamente con ficoeritrina (PE) a una concentración de 1 µg/ml. El anticuerpo se preincuba con el anticuerpo competidor sin marcar A0 durante 10 min a

20 4°C en la proporción molar indicada. Posteriormente, se incuban 1x10⁵ células Ramos durante 30 min con la mezcla de anticuerpos en hielo. Posteriormente, las células se lavan dos veces en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), se resuspenden en tampón FACS y se miden en un BD FACS Canto. Los resultados de dicho ensayo se muestran en la Figura 1. La adición de un anticuerpo IgG1 control humano (Sigma IgG1 kappa) en un exceso molar de 20 veces no reduce significativamente la

25 intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células Ramos. La adición del anticuerpo HH1 o del anticuerpo A0 sin marcar en un exceso molar de 20 veces suprimió casi completamente la unión del anticuerpo HH1 marcado directamente. Esto indica que los anticuerpos A0 y HH1 reconocen epítomos idénticos o similares en las células Ramos y que compiten para unirse al antígeno CD37 celular.

30 Ejemplo 3

B 25
36

Unión de versiones humanizadas del mAb A0 al antígeno CD37 celular

Las versiones humanizadas de A0 se ensayan para determinar su unión al antígeno CD37 celular por análisis FACS. Los anticuerpos se añaden a las células Ramos en las concentraciones indicadas y se permite que se unan durante 30 min a 4°C. Posteriormente, el anticuerpo unido se detecta con anticuerpo anti-IgG humana de cabra marcado con PE (Sigma), las células se lavan dos veces con PBS y posteriormente las células se resuspenden en tampón FACS y se analizan por FACS en un BD FACS Canto. Se muestran ejemplos en las Figuras 2 y 3 (anticuerpos A, B, C, D, I o A, H, I, J, K, L y M, respectivamente; véase la Tabla 1). Varias de las versiones humanizadas de A0 muestran una unión similar a las células Ramos respecto al anticuerpo parental A0, lo que indica que la humanización no reduce la unión al antígeno CD37 celular.

Ejemplo 4

Análisis scatchard por FACS de las versiones humanizadas del mAb quimérico A0

La afinidad de las versiones humanizadas del anticuerpo A0 (designadas B, C, D, H, I y K; véase la Tabla 1) para el antígeno CD37 celular se determina por análisis scatchard por FACS como se describe en otra parte (Brockhoff et al., 1994). Brevemente, se preparan diluciones del anticuerpo en una placa de 96 pocillos empezando con 100-400 nM en el primer pocillo (80 µl), seguido de 11 etapas de dilución (1:2, 40 + 40 µl). 50 µl de las diluciones del mAb se añaden a tubos FACS, 150 µl de células ($0,8 \times 10^6 / \text{ml} = 1,2 \times 10^5$ células/tubo) se añaden a cada tubo FACS. Las células se mezclan suavemente y se incuban durante 1 h en hielo. Posteriormente, se añaden 50 µl de anticuerpo secundario conjugado con FITC (conc. 15 µg/ml; mAb de ratón anti-todas las subclases de IgG humana, Zymed 05-4211) se mezcla y se incuba durante 30 min. en hielo. Posteriormente, se añaden 4 ml de PBS pH 7,2 que contiene 0,02% de ácido, las células se sedimentan y se resuspenden en 300 µl de PBS pH 7,2 y se someten a análisis por FACS utilizando un BD FACS Canto. Todas las etapas experimentales se realizan en hielo común, todas las diluciones de anticuerpo se hacen en PBS/ 0,5%BSA + 0,02% de ácido. La calibración de FACS se realiza utilizando Quantum FITC MESF (Premix) High Level Beads (Bangs Laboratories). Todas las muestras se miden utilizando los mismos parámetros FACS. La proporción de IgG unida frente a IgG libre se calcula a partir de los valores MFI a diferentes

concentraciones de anticuerpo y se muestran como una representación scatchard. La Figura 4 muestra la relación MFI/ concentración de anticuerpo de varias variantes humanizadas de A0. Los resultados muestran una unión similar a las células Ramos de algunas de las versiones humanizadas respecto al anticuerpo de partida, con constantes de disociación (K_d) que varían de 2,15 a 4,90 nanomoles/litro.

Ejemplo 5

Actividad ADCC de versiones humanizadas del mAb quimérico A0

La capacidad de las versiones humanizadas de A0 (designadas B, C, D, H, J, K; véase la Tabla 1) para mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) se evalúa utilizando células Ramos como células diana y PBMC humanas estimuladas con IL-2 como células efectoras. Las células Ramos (linfoma de Burkitt; ATCC #CRL-1596) se obtuvieron de ATCC. Las células se crecen en frascos de cultivo de tejidos (175 cm²) utilizando RPMI-1640 + GlutaMAX suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 12,5 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 1% de MEM aminoácidos no esenciales como medio de cultivo. Las células se cultivan con una densidad inicial de 3×10^5 células/ml a 37°C y 5% CO₂ en una atmósfera humidificada durante tres días. Los cultivos se mantienen a una concentración celular entre 3×10^5 y $1,8 \times 10^6$ /ml por sub-cultivo en una proporción 1:6 con medio de cultivo fresco 2-3 veces por semana. Una alícuota del cultivo celular a una densidad celular entre $1,5 \times 10^6$ /ml y $1,8 \times 10^6$ /ml y creciendo en la fase log se centrifuga (200 x g, es decir, 1.000 rpm) durante 10 min. Las células se lavan una vez con medio de lavado (RPMI 1640 sin L-glutamina) y se sedimentan (200 x g, es decir, 1.000 rpm; 10 min). El sedimento celular se resuspende en medio de ensayo [1% BSA en RPMI sin L-glutamina] y se determina el número de células. La concentración celular se ajusta a 2×10^5 /ml.

Se utilizan aproximadamente 50 - 80 ml de sangre completa obtenida de donantes sanos para el aislamiento de PBMC. Se diluyen 10 ml de sangre completa 1:3,6 con 26 ml de HBSS (Disolución Salina Equilibrada de Hanks sin calcio ni magnesio) en un tubo de 50 ml. Se pone una capa con 18 ml de sangre completa diluida encima de 12 ml de Lymphoprep (Nycomed Pharma) en un tubo de 50 ml y se centrifuga a 370 x g (1.400rpm) durante 35 min. Las células mononucleares de la interfase se aspiran y se lavan primero con HBSS (750 x g, es decir, 1.900 rpm; 10 min) y una segunda vez con HBSS (300 x g, es decir, 1.200 rpm; 10 min) y por

27 26 37

último con HBSS (160 x g, es decir, 900 rpm; 10 min). Las células sedimentadas se resuspenden suavemente en medio de cultivo/medio de ensayo (10% de suero AB humano inactivado con calor en RPMI 1640 sin L-glutamina) utilizando una pipeta y el número de células se determina en el contador celular. La concentración de PBMC se ajusta a 1×10^7 /ml. Las PBMC recién aisladas (5×10^5 /ml) se mantienen en medio de cultivo (RPMI 1640 sin L-glutamina suplementado con 10% de suero AB humano) en un frasco de cultivo de tejidos (75 cm²) a 37°C en un incubador con CO₂ toda la noche. Al día siguiente, las células se estimulan con IL-2h a una concentración final de 1 U/ml durante 3 días más. Las PBMC estimuladas con IL-2 se separan de los restos celulares en un gradiente Lymphoprep. Las PBMC estimuladas con IL-2 purificadas se suspenden en medio de cultivo/medio de ensayo a una concentración de 1×10^7 /ml.

El co-cultivo de las células efectoras con las células diana en presencia de anticuerpo específico o inespecífico se realiza en duplicado o triplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo en un volumen final de 200 µl de medio de ensayo por pocillo que consiste en 10% de suero AB humano y 1% BSA en RPMI en una proporción 1:1. Primero se plaquean las células efectoras (células PBMC recién aisladas en 100 µl de 10% de suero AB humano en RPMI por pocillo), seguido de las células diana y la disolución de anticuerpo diluida en 50 µl de 1% BSA en RPMI. Como control, las células efectoras se cultivan en medio de ensayo solo (control de células efectoras) y las células diana se cultivan en medio de ensayo solo (lisis espontánea) o en medio de ensayo suplementado con 1% Tritón X-100 (lisis máxima). El co-cultivo se incuba a 37°C en un incubador húmedo con CO₂ durante 3 horas. Al final de la incubación, las células se separan del medio de cultivo por centrifugación (200 x g, es decir, 1.000 rpm; 10 min) a temperatura ambiente. Los sobrenadantes sin células (100 µl/pocillo) se transfieren a los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Para determinar la actividad LDH en estos sobrenadantes, se añaden 100 µl de mezcla de reacción (250 µl de catalizador recién mezclado con 11,25 ml de disolución de tinción) a cada pocillo y se incuba 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Después, se mide la absorbancia como se describe a continuación.

Se utiliza el Kit de Detección de la Citotoxicidad (LDH; Roche) para medir la actividad ADCC. La detección de la citotoxicidad se basa en la medida de la actividad de la enzima LDH liberada de la membrana plasmática de las células dañadas. La LDH liberada en los sobrenadantes del cultivo reduce la sal de tetrazolio del kit a formazán. El máximo de absorción del colorante formazán se mide a 490 nm frente a

una longitud de onda de referencia de 650 nm en un lector de placas ELISA. Para calcular el porcentaje de citotoxicidad mediada por células se realizan cinco controles en cada experimento.

- 5
- Control de fondo I (1): Actividad LDH contenida en el medio de ensayo, que se sustrae de los valores (3) y (5).
- Control de fondo II (2): Actividad LDH contenida en 1% Tritón-X100 en el medio de ensayo, que se sustrae de los valores máximos de liberación de LDH (4).
- 10
- Liberación de LDH espontánea (3): Actividad LDH liberada de las células diana solas.
- Liberación de LDH máxima (4): Actividad LDH máxima liberable en las células diana.
- Control de células efectoras (5): Actividad LDH liberada de las células efectoras solas.

15

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediada por células, se calcula la absorbancia media de los triplicados o duplicados y el fondo se sustrae según las instrucciones del fabricante. En la Figura 5, se muestran los resultados de un ensayo ADCC utilizando una proporción E:T de 25:1 y células Ramos diana. Los anticuerpos se añaden en una concentración de 30 ng/ml. Tanto el mAb de partida como las versiones humanizadas de éste muestran una actividad ADCC similar frente a las células Ramos. En conclusión, la humanización del mAb A anti-CD37 no altera significativamente su capacidad para inducir ADCC.

20

25 Ejemplo 6

Actividad pro-apoptótica de versiones humanizadas del mAb quimérico A0

30

La actividad pro-apoptótica del mAb A0 (=A) y las versiones humanizadas de éste (B, C, D e I; véase la Tabla 1) se evalúa midiendo las células AnexinaV/ PI positivas después de la incubación de las células Ramos con los mAb. Las células Ramos (linfoma de Burkitt; ATCC #CRL-1596) se reciben de ATCC. Las células se crecen en frascos de cultivo de tejidos (175 cm²) utilizando RPMI-1640 + GlutaMAX suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 12,5 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 1% de MEM aminoácidos no esenciales como medio de cultivo.

35

Las células se cultivan con una densidad inicial de 3x10⁵ células/ml a 37°C y 5% CO₂

27
28

en una atmósfera humidificada durante tres días. Los cultivos se mantienen a una concentración celular entre 3×10^5 y $1,8 \times 10^6$ /ml por sub-cultivo en una proporción 1:6 con medio de cultivo fresco 2-3 veces por semana. Una alícuota del cultivo celular a una densidad celular entre $1,5 \times 10^6$ /ml y $1,8 \times 10^6$ /ml y creciendo en la fase log se centrifuga (200 x g, es decir, 1.000 rpm) durante 10 min. Las células se lavan una vez con medio de lavado (RPMI 1640 sin L-glutamina) y se sedimentan (200 x g, es decir, 1.000 rpm; 10 min). El sedimento celular se resuspende en medio de cultivo y se determina el número de células. La concentración celular se ajusta a 1×10^6 /ml. Se plaquean 100 μ l de suspensión celular por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Los anticuerpos se diluyen en medio de cultivo celular que contiene 10% de FBS y se añaden por pocillo 100 μ l de disolución de anticuerpo. Las células se incuban durante 20 a 24 hrs a 37°C en un incubador con CO₂ y posteriormente se tiñen con el kit #2 de ensayo de apoptosis Vybrant. Se añaden Anexina V marcada con Alexa Fluor 488 y disolución de yoduro de propidio a las células y se incuban durante 15 min en oscuridad. Posteriormente, las células se resuspenden en 400 μ l de tampón de unión de Anexina V y se someten a análisis FACS utilizando un BD FACS Canto. El porcentaje de células Anexina V positivas/ PI negativas y Anexina V/ PI positivas se determina en hibridaciones sobre mancha bidimensionales utilizando los canales FL1/ FL2. Como control negativo se utiliza un anticuerpo correspondiente en isotipo que no se une (Sigma IgG1 humana).

En la Figura 6, se muestra el efecto pro-apoptótico de varias versiones humanizadas del mAb A en células Ramos. Las células se incuban con anticuerpo a 10 μ g/ml durante 24 hrs, se muestra el porcentaje total de células Anexina V positivas (PI positivas y PI negativas). El mAb A parental muestra una actividad pro-apoptótica potente. Sorprendentemente, las versiones humanizadas muestran un número significativamente reducido de células Anexina V positivas comparado con el mAb A parental, lo que es indicativo de una actividad pro-apoptótica alterada de los anticuerpos humanizados. En conclusión, la humanización del MAb A da lugar a una reducción de su actividad pro-apoptótica en este diseño experimental.

30

Ejemplo 7

Actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb quimérico A0

La actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0 (designadas A1, A2, A3, A4, véase la Tabla 2) se evalúa utilizando células Ramos

35

como células diana. El ensayo de ADCC se realiza como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). El resultado del experimento se muestra en la Figura 7. Las versiones con Fc modificada por ingeniería de A0 muestran una potencia y eficacia claramente mejoradas comparadas con el mAb A0 parental. Determinadas variantes de Fc muestran una mejora en la lisis máxima de hasta el 100% comparada con el mAb parental y una mejora en la CE_{50} de hasta 10 veces comparada con el mAb parental. En conclusión, la introducción de mutantes de Fc específicos incrementa de forma importante la actividad ADCC del mAb quimérico A0.

10 Ejemplo 8

Actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb B0

La actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb B0 (designadas B1, B2, B3, B4; véase la Tabla 2) se evalúa utilizando células Ramos como células diana. El ensayo de ADCC se realiza como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). Las versiones con Fc modificada por ingeniería de B0 muestran una potencia y eficacia claramente mejoradas comparadas con el mAb B0 parental. Determinadas variantes de Fc muestran una mejora en la lisis máxima de hasta el 80% comparada con el mAb parental y una mejora en la CE_{50} de hasta 20 veces comparada con el mAb parental. En conclusión, la introducción de mutantes de Fc específicos incrementa de forma importante la actividad ADCC del mAb B0 humanizado. Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 9

25 Actividad pro-apoptótica de los mAb A0 y B0

La actividad pro-apoptótica de los mAb A0 y B0 en células Ramos antes y después del entrecruzamiento con mAb anti-IgG se muestra en la Figura 9. El ensayo apoptótico se realiza como se describe en el Ejemplo 6, para el entrecruzamiento del anticuerpo se añade un anticuerpo anti-IgG humana (específico de la cadena γ ; Sigma) a los anticuerpos en una proporción 1:1 y se incuba durante 15 min a 37°C antes de añadirlo a las células diana. En la Figura 9 se añaden los mAb específicos de CD37 a una concentración de 1 μ g/ml con y sin entrecruzamiento. El mAb quimérico A0 es un inductor potente de la apoptosis incluso sin entrecruzamiento, este efecto se incrementa significativamente después del entrecruzamiento del mAb.

29
28
37

Sorprendentemente, sin entrecruzamiento, el mAb B0 humanizado carece completamente de actividad pro-apoptótica, sin embargo muestra una actividad pro-apoptótica potente después del entrecruzamiento con Ab anti-IgG. En conclusión, este experimento muestra que la actividad pro-apoptótica de una versión humanizada del mAb A0 puede restaurarse después del entrecruzamiento del anticuerpo.

Ejemplo 10

Actividad pro-apoptótica de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0

La actividad pro-apoptótica de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb quimérico A0 en células Ramos se evalúa por tinción con AnexinaV/ PI como se describe en el Ejemplo 6. El anticuerpo A0 parental y las variantes con Fc modificada por ingeniería A2 y A4 se titulan en un intervalo de concentración de 0,1 a 10.000 ng/ml. Como puede observarse en la Figura 10, los 3 anticuerpos muestran una actividad pro-apoptótica similar. En conclusión, este experimento muestra que la modificación por ingeniería de Fc del mAb A0 no altera su actividad pro-apoptótica.

Ejemplo 11

a) Actividad supresora de células B de los anticuerpos con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 en un ensayo con sangre completa

La eficacia y potencia de supresión de células B normales de la sangre humana se evalúa utilizando un ensayo con sangre completa. En este formato de ensayo, el anticuerpo de ensayo se añade a muestras tratadas con EDTA de sangre humana de individuos sanos y, posteriormente, después de 3 a 4 h de incubación a 37°C, se mide cuantitativamente el número de células B mediante un ensayo FACS de 4 colores. Comparando con los controles de tampón o IgG, puede calcularse el grado de supresión de las células B por el agente de ensayo. Debido a la presencia de niveles de IgG humana y de células efectoras similar a la situación en los seres humanos *in vivo*, este tipo de ensayo se considera que tiene una alta relevancia para predecir el efecto de los anticuerpos de ensayo *in vivo*.

Se utiliza un ensayo FACS cuantitativo para determinar el número de células B y/o células Ramos adicionadas en muestras de sangre obtenidas de individuos sanos. La cuantificación se realiza utilizando tubos BD Trucount que contienen un número conocido de lechos fluorescentes que sirven como estándar interno para la

cuantificación de la población celular de interés. Las células B se identifican por análisis de 4 colores utilizando 4 marcadores CD diferentes (CD3/ CD14/ CD19/ CD45) en combinación con análisis FSC/ SSC.

Se incuban 270 µl de sangre fresca por pocillo en una placa de 48 pocillos con 30µl de dilución de anticuerpo (en PBS) o PBS (control de tampón) en duplicado. Las muestras se incuban durante 4h a 37°C y, posteriormente, se ponen inmediatamente en hielo. Se añaden 33 µl de mezcla de marcador CD a tubos Trucount y se añaden 50 µl de la mezcla sangre-anticuerpo. Las muestras se agitan con vórtex y se incuban durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añaden 450 µl de tampón de lisis, se agita con vórtex y se incuba durante 15 min adicionales a temperatura ambiente. Las muestras se ponen en hielo y se someten inmediatamente a análisis FACS utilizando un Citómetro de Flujo BD FACS Canto™. La evaluación de los datos se realiza utilizando el programa informático BD FACSDiva (Versión 5.0.2).

Los mAb con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 quiméricos y humanizados muestran una potencia excelente en la supresión de células B normales con valores de CE_{50} que varían de 0,15 a 0,35 nM. El grado de supresión de las células B normales varía de 57% a 65%. Rituximab, un anticuerpo registrado utilizado para el tratamiento de B-NHL, se ensaya en paralelo y rinde una supresión de las células B significativamente menor en este formato de ensayo (Figura 11 A).

20

b) La modificación de Fc por ingeniería introduce una actividad de supresión de células B superior de A0 y B0 comparada con Rituximab

El efecto de los mAb en la supresión de células B en sangre humana obtenida de individuos sanos se evalúa como se describe en a). Los mAb con Fc sin modificar por ingeniería A0 y B0 muestran una actividad de supresión de células B en el intervalo de 13% a 26%, similar a Rituximab. La modificación de Fc por ingeniería resulta en un incremento importante de la actividad de supresión de células B para los dos mAb, con un porcentaje medio de supresión del 75%. Esto demuestra claramente la superioridad de A2 y B2 comparada con Rituximab (Figura 11 B)

30

c) Los anticuerpos A2 y B2 no suprimen células T y monocitos en ensayos con sangre completa

El efecto de A2 y B2 en linfocitos T (CD3-positivos) y monocitos (CD14-positivos) se evalúa en paralelo al efecto sobre linfocitos B. No se observa cambio significativo alguno en el número de células T o el número de monocitos, mientras que se ve una

35

D-29
A0

reducción significativa del número de células B (Figura 11C). Esto indica que A2 y B2 suprimen específicamente células B de la sangre humana.

Ejemplo 12

- 5 La modificación de Fc por ingeniería introduce una actividad ADCC superior comparada con Rituximab

La actividad ADCC de la versión con Fc modificada por ingeniería A2 del mAb A0 se evalúa utilizando células Ramos como células diana. El ensayo de ADCC se realiza como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). El anticuerpo con Fc sin modificar por ingeniería A0 muestra una lisis máxima de las células diana Ramos que es inferior a Rituximab, un anticuerpo específico para CD20 que es un tratamiento aprobado para pacientes que padecen linfomas de células B. Sorprendentemente, la modificación de Fc por ingeniería de A0 da lugar a una potencia y eficacia claramente mejoradas de A2 sobre Rituximab. Esto indica, que a unas densidades de antígeno similares de CD20 y CD37 en células Ramos, el mAb anti-CD37 con Fc modificada por ingeniería A2 muestra una actividad ADCC claramente mejorada comparada con Rituximab (Figura 12).

20 Ejemplo 13

Actividad supresora de células de linfoma de los anticuerpos con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 en un ensayo con sangre completa

La eficacia y potencia de supresión de células Ramos, una línea celular obtenida del linfoma de Burkitt de sangre humana, se evalúa utilizando un ensayo con sangre completa como se describe en el Ejemplo 11. En una modificación del ensayo, las células tumorales Ramos se adicionaron en un exceso de aproximadamente diez veces comparadas con las células B endógenas en la matriz de sangre completa y también se evalúa su supresión por análisis FACS. Los mAb con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 quiméricos y humanizados muestran una buena potencia en la supresión de células Ramos con valores de CE_{50} que varían de 0,35 a 0,54 nM. El grado de supresión de las células Ramos varía de 36% a 55%. Rituximab, un anticuerpo registrado utilizado para el tratamiento de B-NHL, se ensaya en paralelo y rinde una supresión de las células Ramos significativamente menor en este formato de ensayo (Figura 13).

Ejemplo 14

Eficacia *in vivo* de los anticuerpos con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 en un modelo de enfermedad

- 5 La eficacia antitumoral *in vivo* de los mAb A2 y B2 se evalúa utilizando un modelo de linfoma Ramos Burkitt en ratones desnudos. Se inyectan subcutáneamente células Ramos CD37 positivas en el flanco de los animales y el tratamiento i.v. de los animales empieza cuando los tumores se han establecido. Se elige un programa de tratamiento de dos veces por semana (q3/4d), se ensayan en paralelo dos dosis
- 10 diferentes (8 mg/kg y 25 mg/kg). Los dos mAb muestran una eficacia antitumoral significativa con valores T/C que varían de 0,2% a 26%. No se observa una diferencia significativa entre los dos niveles de dosis ni entre los dos anticuerpos. Sin embargo, existe una tendencia hacia una mejor eficacia en los animales tratados con la dosis alta de A2, con T/C de 0,2% y 5/10 regresiones completas del tumor. Todos los
- 15 tratamientos se toleraron bien sin pérdida de peso aparente. En conclusión, los mAb A2 y B2 mostraron una eficacia antitumoral significativa en el modelo de linfoma de Ramos Burkitt, con una actividad máxima obtenida ya con el nivel de dosis 8 mg/kg. La actividad es comparable con la del rituximab que se ensaya en paralelo. Tiene que indicarse que la actividad *in vivo* observada con los anticuerpos con Fc modificada por
- 20 ingeniería A2 y B2 puede subestimarse ya que estos mAb están optimizados para interaccionar con células efectoras humanas pero no murinas. Esta interacción optimizada, que da lugar a una actividad ADCC *in vitro* muy mejorada cuando se utilizan células efectoras humanas (Ejemplo 8), no se refleja en el modelo de ratón utilizado. Sin embargo, los datos obtenidos en este experimento (mostrados en la
- 25 Figura 14) proporcionan una prueba *in vivo* del concepto de CD37 como diana y pueden utilizarse así para estimar la dosis terapéutica en los seres humanos.

Ejemplo 15

- 30 Correlación del efecto farmacocinético y farmacodinámico de A2 y B2 en ratones para estimar la dosis terapéutica en los seres humanos

- Utilizando el modelo de xenoinjerto de tumor de Ramos se establece una correlación entre las concentraciones séricas de A2 y B2 respecto a su efecto farmacodinámico en ratones. Estos estudios demuestran que una dosis de 8 mg/kg de
- 35 A2 y B2 (formulada en tampón citrato: 25 mM Na-Citrato, 115 mM NaCl, 0,04% Tween

31/30
AT

80, pH 6,0) causa un retraso significativo del crecimiento tumoral en este modelo tumoral agresivo s.c. (subcutáneo) utilizando un programa de dosificación estándar del anticuerpo q3 ó 4d en ratones, lo que indica así una actividad continua a lo largo del intervalo de dosificación. Además, los datos farmacocinéticos se establecen para la misma dosis.

Utilizando esta asociación PK/PD en ratones, puede calcularse una dosis humana estimada utilizando datos publicados para el aclaramiento (CL) de anticuerpos humanizados en los seres humanos (Lobo et al., 2004).

Cálculo completo para A2:

- $AUC(0-\infty)$ media después de una dosis única de 8 mg/kg = 6.099 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$
- $AUC(0-\infty)$ dada en ratones = $AUC(ss,\tau)$ en ratones y $AUC(ss,\tau)/\tau = C(ave,ss)$
- $C(ave,ss)$ en ratones (para $\tau = 84$ horas) = 73 $\mu\text{g/mL}$, que es equivalente presumiblemente a $C(ave,ss)$ en los seres humanos (para $\tau = 168\text{h}$).
- Como $AUC(ss,\tau)$ en los seres humanos = D/CL , y utilizando el intervalo de aclaramiento (CL) de anticuerpos humanizados en los seres humanos publicado por Lobo et al, 2004.: $CL = 7 \text{ mL/h/70 kg}$ a 15 mL/h/70 kg .
- Para 7 mL/h/70 kg: $168 \text{ hr} \times 7 = 1.176 \text{ mL} \times 73 \mu\text{g} = 86 \text{ mg}$
- Para 15 mL/h/70 kg: $168 \text{ hr} \times 15 = 2.520 \text{ mL} \times 73 \mu\text{g} = 184 \text{ mg}$

Por lo tanto, para A2, la dosis semanal estimada para un ser humano de 70 kg está en el intervalo de 86 a 184 mg. Utilizando las mismas asunciones descritas anteriormente, la dosis semanal humana estimada calculada para B2 para un ser humano de 70 kg es 189 a 404 mg.

Ejemplo 16

Los anticuerpos A2 y B2 muestran actividad ADCC en células de mieloma múltiple

La expresión de CD37 en un panel de líneas celulares de mieloma múltiple se evalúa por análisis FACS utilizando anticuerpos específicos para CD37. Las células se incuban con un anticuerpo anti-CD37 marcado directamente con fluorescencia o con un anticuerpo específico de CD37 sin marcar seguido de un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia dirigido contra el anticuerpo primario. La actividad de fluorescencia de las células marcadas se mide con un Citómetro FACS Canto Flow (BD Biosciences) y la intensidad de la fluorescencia se registra como MFI utilizando el Programa Informático FACS Diva. 6 de los 11 mielomas múltiples ensayados

demuestran la expresión de CD37 en la superficie de las células (Figura 15). Una línea celular (RPMI 8226) se ensaya posteriormente en un ensayo ADCC como se describe en el Ejemplo 5 utilizando los anticuerpos específicos de CD37 A2 y B2. Los dos anticuerpos demuestran una actividad ADCC potente en células RPMI 8226 con valores CE_{50} en el intervalo de 25 ng/ml y una lisis celular máxima de aproximadamente 20% (Figura 16). Este ejemplo demuestra que las células de mieloma múltiple CD37 positivas son susceptibles de lisis celular mediada por ADCC utilizando los mAb específicos de CD37 A2 y B2.

La Figura 15 muestra el análisis FACS de seis líneas celulares de mieloma múltiple para la expresión de CD37. Las curvas sin rellenar indican reactividad con el anticuerpo específico de CD37, las curvas rellenas representan el anticuerpo control negativo.

Ejemplo 17

Actividad pro-apoptótica de los anticuerpos A2 y B2 en células CLL derivadas de pacientes

La actividad pro-apoptótica de A2 y B2 se evalúa en células de leucemia linfocítica crónica (CLL – siglas en inglés) derivadas de pacientes. Se preparan células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs – siglas en inglés) a partir de un paciente al que se le ha diagnosticado CLL, después de haber obtenido consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki. Las células de CLL primarias se purifican a partir de sangre recientemente recogida de acuerdo con el proceso de Ficoll-Paque® plus (StemCell Technologies, Meylan, Francia) y se almacenan a 4°C en medio de cultivo RPMI 1640 que contiene suero AB humano al 10 %, inactivado por calor (Sigma, Francia) hasta su uso. El medio de cultivo para células CLL primarias es RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM y suero AB humano al 10 %, inactivado por calor. Para el uso experimental, se recuentan células CLL primarias en un hemocitómetro y su viabilidad se evalúa mediante la exclusión de azul de tripano al 0,25%. La viabilidad de muestras de CLL es mayor que 90%. Las células se incuban a 37°C durante 24 horas con los anticuerpos a razón de 30 µg/ml y, después de ello, se determina el porcentaje de células AnexinaV positivas según se describe en el Ejemplo 6. Tal como se muestra en la Figura 17, los anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería muestran una fuerte actividad pro-apoptótica sobre las células CLL primarias, con aproximadamente 90% de células (A2) y 40% de células

32 ~~31~~ 7

(B2) AnexinaV positivas. Los dos anticuerpos son claramente superiores a rituximab, un anticuerpo específico para células B aprobado para el tratamiento de B-NHL. El mAb A2 demuestra también una actividad claramente superior, en comparación con alemtuzumab, un anticuerpo aprobado para el tratamiento de B-CLL.

5

Ejemplo 18

Generación de un modelo de ratón transgénico, en el que el antígeno diana endógeno CD37 se reemplaza por su homólogo humano

- 10 Se construye un vector de direccionamiento que contiene la secuencia codificadora del gen CD37 humano (BAC (cromosoma bacteriano artificial) IDs: RP11-433N13, RP11-50111) flanqueada por secuencias que no se traducen. Este vector de direccionamiento (que contiene, además, los exones 3 – 4 flanqueantes de los sitios loxP y el marcador de la selección neo flanqueado por los sitios frt) se utiliza para
- 15 recombinación homóloga utilizando células ES de ratón y tecnología estándar para reemplazar los exones 1-8 de la secuencia genómica de ratón con las secuencias homólogas humanas. Para este propósito, la línea celular C57BL/6N ES se crece en una capa alimentadora inactivada mitóticamente comprendida por fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) en medio DMEM High Glucose que contiene 20% FBS
- 20 (PAN) y 1.200u/mL del Factor Inhibidor de Leucemia (Millipore ESG 1107). Se electroporan 1×10^7 células y 30 g de ADN linearizado del vector (Biorad Gene Pulser) a 240 V y 500 F. La selección con G418 (200 g/mL) empezó en d2. La contraselección con Ganciclovir (2 M) empieza en d5 después de la electroporación. Los clones ES se aíslan en d8 y se analizan por Transferencia Southern según los procedimientos
- 25 estándar, por ejemplo, mediante la utilización de sondas de ADN marcadas radiactivamente específicas para el gen diana después de la expansión y congelación de los clones en nitrógeno líquido. Entonces se generan los animales transgénicos por procedimientos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, por inyección de blastocitos y la generación posterior de animales quiméricos. Los animales
- 30 heterocigotos y homocigotos para CD37 humano se obtienen por la cría convencional de animales quiméricos y heterocigotos, respectivamente. La desactivación exitosa del gen CD37 murino y la activación del gen CD37 humano se evalúa a nivel de proteínas utilizando procedimientos estándar, por ejemplo, análisis FACS de los linfocitos de sangre periférica o análisis inmunohistoquímico de secciones de tejido.

35

Ejemplo 19

Generación de anticuerpos sustitutos

Se generan anticuerpos monoclonales específicos de CD37 de macaco por la inmunización genética de ratones y conejos utilizando la secuencia codificadora completa del antígeno CD37 de macaco. (Acc. No ENSMMUT00000020744). Los anticuerpos específicos se seleccionan utilizando células HEK293 o CHO recombinantes que expresan el antígeno CD37 de macaco, por ejemplo, por técnicas ELISA o FACS estándar. Las secuencias codificadoras de las cadenas pesadas y ligeras variables de estos anticuerpos se recuperan por clonación con PCR y se utilizan para la generación de anticuerpos quiméricos (como se describe en el Ejemplo 1) que contienen la región VH y VL obtenida del anticuerpo murino o de conejo de partida y una parte Fc idéntica a la de un anticuerpo de la invención, por ejemplo A2 o B2. Las propiedades de unión y funcionales pueden investigarse mediante la utilización de sistemas de ensayo que utilizan células que expresan CD37 de macaco como células diana, por ejemplo, para unión, FACS, análisis de Scatchard, ensayos de ADCC y apoptosis. Finalmente, el anticuerpo sustituto se selecciona gracias a su actividad supresora de células B en sangre de mono *Cynomolgus in vitro*.

Ejemplo 20

Preparación de clones para producir anticuerpos

Con el fin de preparar clones para producir anticuerpos de la invención, por ejemplo los anticuerpos A2, A4, B2 o B4, la molécula de ADN que codifica la cadena pesada completa con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 27, 31, 35 ó 39, respectivamente, se inserta en el vector de expresión eucariota designado pBI-26, que codifica además el marcador de selección dihidrofolato reductasa de hámster.

La molécula de ADN que codifica la cadena ligera completa, mostrada en SEQ ID NO: 29, 33, 37 y 41, respectivamente, se inserta en el vector de expresión eucariota designado pBI-49, que codifica además el marcador de selección neomicina fosfotransferasa. Las secuencias de ADN de las cadenas pesada y ligera completas se secuencian completamente.

La línea celular de hámster CHO-DG44, crecida en suspensión en un medio definido químicamente, se co-transfecta con los vectores de expresión eucariotas para la cadena pesada y para la cadena ligera de los anticuerpos, como se ha descrito anteriormente. Las células transfectadas se seleccionan en medio sin hipoxantina ni timidina y en presencia del antibiótico G418. Posteriormente, las células se someten a una selección y amplificación por etapas utilizando concentraciones crecientes de

32
30 43

metotrexato (MTX). A partir de la etapa de amplificación 800 nM MTX, se selecciona un único clón celular tomando como base el comportamiento del crecimiento y la producción de anticuerpo en ciclos de centrifugación y se conserva congelado en un Safety Cell Bank (SCB).

Referencias

- American Cancer Society (Cancer Facts & Figures 2005).
- 5 Baker y Jones, *Curr Opinion in Drug Discovery & Development*, 10, 219-227, 2007.
- Barbas, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813, 1994.
- Barrena et al., *Leukemia* 19: 1376-1383, 2005.
- Belov et al., *Cancer Research* 61: 4483-4489, 2001.
- Boulianne G. L., Hozumi N. y Shulman, M .J., Production of functional chimeric
 10 mouse/human antibody. *Nature* 312: 643, 1984.
- Brockhoff G, Hofstaedter F, Knuechel R., *Cytometry* 1994, 17(1):75-83.
- Buchsbaum et al., *Cancer Research* 52: 6476-6481, 1992.
- Chothia y Lesk., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987.
- Coiffier B, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of
 15 patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II
 study. *Blood* 1998; 92: 1927-1932.
- Coiffier, *JCO*, 23, 6387-93, 2005.
- Edelman et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 78-85, 1969.
- Feugier P, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly
 20 patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des
 Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4117-4126.
- Foran JM, et al. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal
 antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously
 25 treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic
 lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 317-324.
- Forstpointner R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine,
 cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate
 and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and
 refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective
 30 randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*,
 2004; 104: 3064-3071.
- Francisco et al., *Blood*, 2003 Aug 15;102(4):1458-65.
- Frank, et al., *Methods Enzymol.* 154: 221-249, 1987.

33
347

- Gait, M.J., *Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, UK (1984).
- Goldenberg DM y Sharkey RM, *Oncogene* (2007) 26, 3734–3744. Novel radiolabeled antibody conjugates.
- 5 Hainsworth JD. Prolonging remission with rituximab maintenance therapy. *Semin Oncol* 2004; 31: 17-21.
- Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 254:889-896, 1992.
- Hayden y Mandecki. Gene synthesis by serial cloning of oligonucleotides. *DNA* 7(8): 571-7, 1988.
- 10 Hertz T, Yanover C: PepDist: A new framework for protein-peptide binding prediction based on learning peptide distance functions. *BMC Bioinform* (2006) 7 (Supl 1):S3-S17.
- Hiddemann W, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study. Group. *Blood* 2005; 106: 3725-3732 (2005a).
- 15 Hiddemann W, et al. Treatment strategies in follicular lymphomas: current status and future perspectives. *J Clin Oncol* 2005b; 23; 6394-6399.
- 20 Howard OM, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1288-1294.
- Ichimura et al., *J. Antibiot. (Tokio)*, 44, 1045-53, 1991.
- 25 Jackson et al., 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9.
- Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 203: 88-98, 1991.
- Jones TD, Hanlon M, Smith BJ, Heise CT, Nayee PD, Sanders DA, Hamilton A, Sweet C, Unitt E, Alexander G, Lo KM et al: The development of a modified human IFN- α 2b linked to the Fc portion of human IgG1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection. *J Interferon Cytokine Res* (2004) 24(9):560-572.
- 30

- Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP: Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of Factor VIII. *J Thromb Haemost* (2005) 3(5): 991-1000.
- Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. y Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5a Ed.). N° de publicación NIH 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991.
- Kahl B, et al. Maintenance rituximab following induction chemoimmunotherapy may prolong progression-free survival in mantle cell lymphoma: a pilot study from the Wisconsin Oncology Network. *Ann Oncol*, 2006; 17: 1418-1423.
- Kaminski et al., *JCO* 10: 1696-1711, 1992.
- Kipriyanow y Le Gall, *Molecular Biotechnology* 26: 39- 60, 2004.
- Knobeloch et al., *MolCellBiol* 20: 5363-5369, 2000.
- van der Kolk LE, Baars JW, Prins MH, van Oers MH. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. *Blood*, 2002, Sept 15;100(6):2257-9.
- McLaughlin P, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2825-2833.
- Lazar et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4005-10, 2006.
- Ling y MacLennan, pp. 302-335 in *Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, 1987.
- Link et al., *Journal Immunol* 137: 3013-3018, 1986.
- Lobo et al., *J Pharm Sci* 2004;93(11):2645-2668.
- Lowman et al., *Biochemistry* 30(45): 10832-10837, 1991.
- Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783, 1992.
- Moldenhauer G., et al., 1987. Biochemical characterization and epitope analysis of B lymphocyte-specific surface antigens defined by clustering workshop monoclonal antibodies. En *Leukocyte Typing 111*. A. McMichael. ed. Oxford University Press, Oxford. p. 378.
- Moldenhauer G.: CD37. *J. Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14: 281-83.
- Press et al., *JCO* 7, 1989.
- Press OW, et al. Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med* 1993; 329: 1219-1224.

- Reche PA, Glutting JP, Zhang H, Reinherz EL: Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. *Immunogenetics* (2004), 56(6):405-419.
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21 edición, Hendrickson R. Ed.
- 5 Romaguera JE, et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J Clin Oncol*, 2005; 23: 7013-7023.
- Sasse et al., *J. Antibiot. (Tokio)*, 53, 879-85, 2000.
- 10 Shier et al., 1995, *Gene* 169:147-155.
- Schwartz-Albiez et al, *Journal Immunol* 140: 905-914, 1988.
- Stemmer et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides, *Gene* 164(1): 49-53, 1995.
- van Spriël et al., *Journal Immunol* 172: 2953-2961, 2004.
- 15 Suzawa et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2175-84, 2000.
- Tangri S, Mothe BR, Eisenbraun J, Sidney J, Southwood S, Briggs K, Zinckgraf J, Bilsel P, Newman M, Chesnut R, LiCalsi C, Sette A: Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. *J Immunol* (2005) 174(6):3187-3196.
- 20 Thomas DA, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2006; 106: 1569-1580.
- Ye et al. Gene synthesis and expression in *E. coli* for pump, a human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 186(1):143-9, 1992.
- 25 Yelton et al., 1995, *Immunol.* 155:1994-2004.
- Zhao et al., *Blood* 104: Resumen 2515, 2004.
- Zhao XB, Lapalombella R, Joshi T, Cheney C, Gowda A, Hayden-Ledbetter MS, Baum PR, Lin TS, Jarjoura D, Lehman A, Kussewitt D, Lee RJ, Caligiuri MA, Tridandapani S, Muthusamy N, Byrd JC. Targeting CD37+ lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical 2007; *BLOOD*, 1 OCTUBRE 2007, VOLUMEN 110, NÚMERO 7 (Epub antes de la impresión. *Blood*. 2007 Abr 17)

35
45 26
B

CAPITULO REIVINDICATORIO

(Solicitud Divisional)

1. Una molécula de anticuerpo humanizado que se une a CD37 humano y que se encuentra definida mediante:
 - a) CDRs contenidas en la cadena pesada variable como se muestra en SEQ ID NO:2,
 - b) CDRs contenidas en la cadena ligera variable como se muestra en SEQ ID NO:4,
 - c) marcos que soportan dichas CDRs que se obtienen a partir de un anticuerpo humano, y
 - d) cadenas pesadas y ligeras constantes que son de un anticuerpo humano.
2. El anticuerpo de la Reivindicación 2, que comprende una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:6, y preferiblemente una cadena liviana variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:12.
3. Un anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho anticuerpo tiene una o más mutaciones en el dominio Fc que modulan una o más funciones efectoras, preferiblemente dicha modulación de la función efectora es un incremento en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.
4. El anticuerpo de la Reivindicación 3, en el que dicha una o más mutaciones en el dominio Fc es una combinación de sustituciones en las posiciones 239 y 332, numeradas según el índice de numeración Kabat de EU, o donde dicha una o más mutaciones en el dominio Fc es una combinación de sustituciones en las posiciones 236 y 332, numeradas según el índice de numeración Kabat de EU, o donde dicha una o más mutaciones en el dominio Fc es una combinación de sustituciones en las posiciones 236, 239 y 332, numeradas según el índice de numeración Kabat de EU, y donde dichas sustituciones son preferiblemente I332E, S239D y G236A.
5. Un anticuerpo que se une a CD37 y que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, y preferiblemente una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38.
6. Un anticuerpo que se une a CD37 y que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40, y preferiblemente una cadena ligera que

36
49
39

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42.

7. Una molécula de ADN que comprende una región que codifica la cadena pesada variable de un anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6.

8. La molécula de ADN de la Reivindicación 7, en la que dicha región codificadora de la cadena pesada variable está fusionada con una región que codifica una cadena pesada constante de origen humano, preferiblemente dicha cadena pesada constante humana es IgG1, y preferiblemente dicha cadena pesada constante humana tiene una o más sustituciones en la región Fc como se definió en la Reivindicación 4.

9. La molécula de ADN de la Reivindicación 8, en la que dicha IgG1 está codificada por una secuencia mostrada en SEQ ID NO:23, o SEQ ID NO:39, o SEQ ID NO:35.

10. Una molécula de ADN que comprende una región que codifica la cadena ligera variable de un anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6.

11. La molécula de ADN de la Reivindicación 10, en la que dicha región codificadora de la cadena ligera variable está fusionada con una región que codifica una cadena ligera constante de origen humano, preferiblemente dicha cadena ligera constante es una cadena kappa.

12. La molécula de ADN de la Reivindicación 11, en la que dicha cadena ligera kappa está codificada por una secuencia mostrada en SEQ ID NO:25, o SEQ ID NO:37, o SEQ ID NO:41.

13. Un vector de expresión que contiene una molécula de ADN de cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 9 y/o una molécula de ADN de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 12, y preferiblemente el vector comprende una molécula de ADN de la Reivindicación 9 y/o la molécula de ADN de la Reivindicación 12.

14. Una célula anfitriona que porta uno o más vectores de expresión de la Reivindicación 13, preferiblemente la célula anfitriona porta un vector de expresión que comprende una molécula de ADN de la Reivindicación 9, y un segundo vector de expresión que comprende una molécula de ADN de la Reivindicación 12, y preferiblemente la célula anfitriona es una célula de mamífero.

15. Un método para producir un anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a

87
A8
22

6, que comprende transfectar una célula anfitriona de mamífero con uno o más vectores de la Reivindicación 13, cultivar la célula anfitriona y recuperar y purificar la molécula de anticuerpo.

16. Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, una o más moléculas de anticuerpos anti-CD37 de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. La composición farmacéutica de la Reivindicación 16, que comprende, además, uno o más agentes terapéuticos adicionales, preferiblemente dichos uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionado entre agentes dirigidos a un antígeno de las células B distinto de CD37, preferiblemente dicho antígeno de las células B es CD20.

18. El método para suprimir células B que expresan CD37 en una población de células, que comprende administrar a dicha población de células una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 o una composición farmacéutica que contiene dicha molécula de anticuerpo, preferiblemente el método se lleva a cabo *in vitro*.

Indicar
pasos

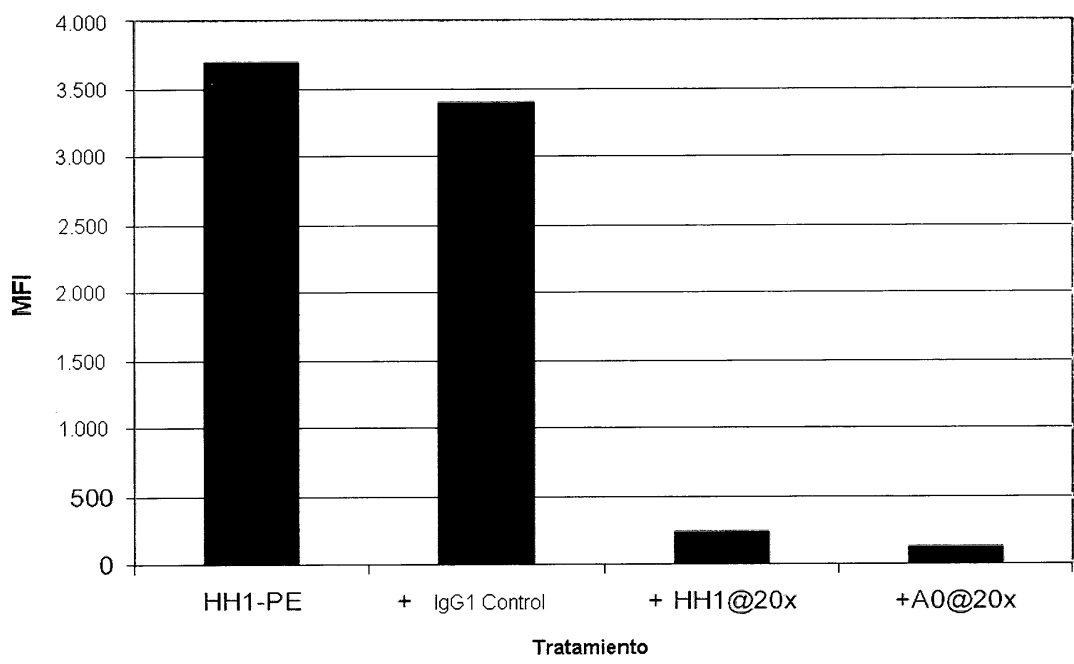
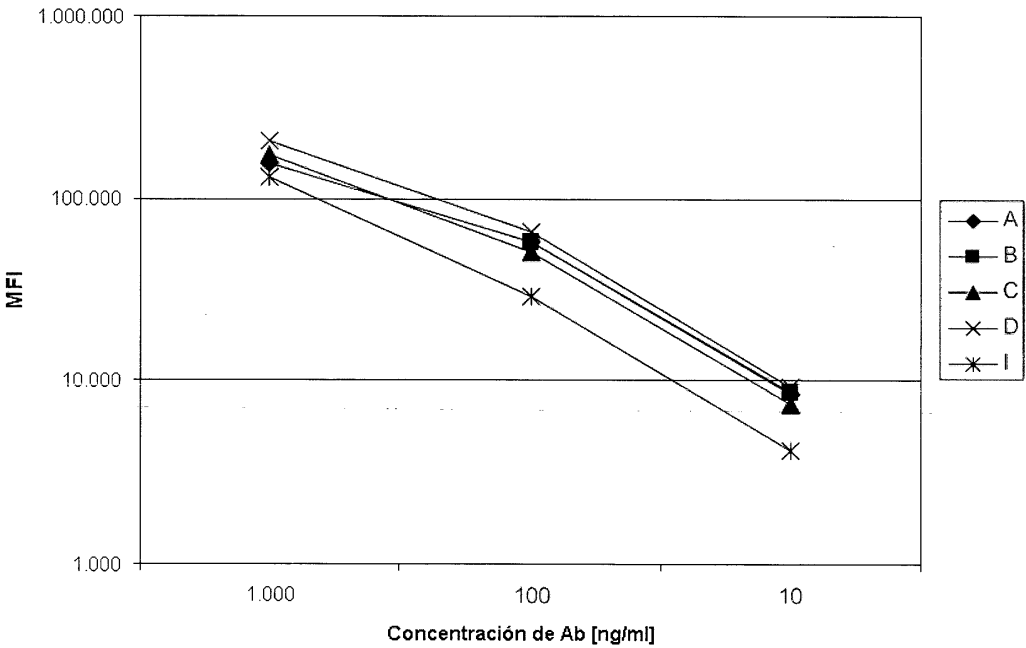


Fig. 1

Fig. 2



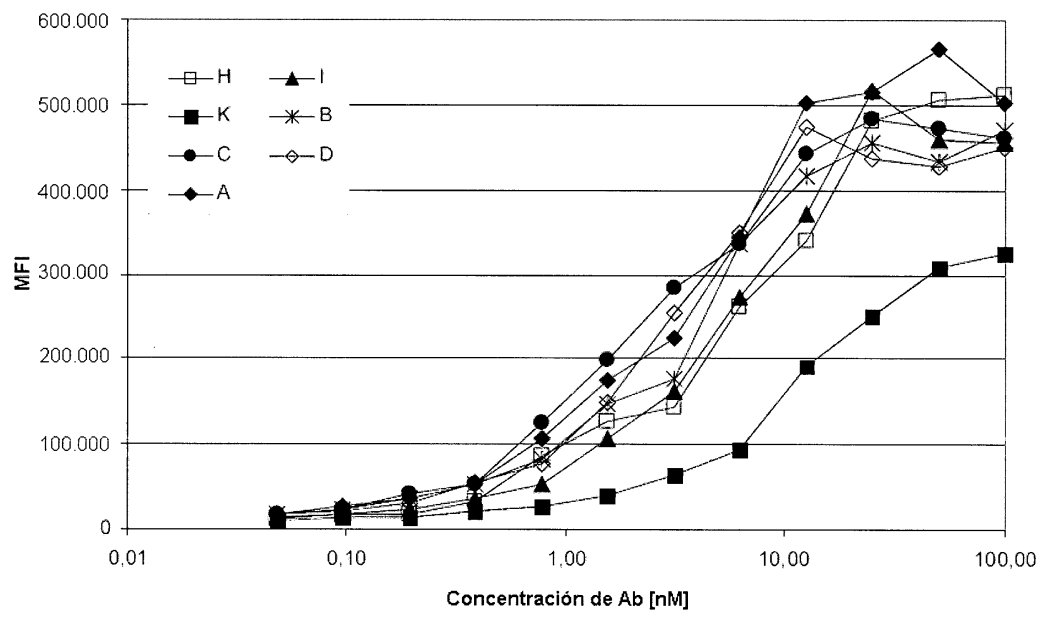


Fig. 4

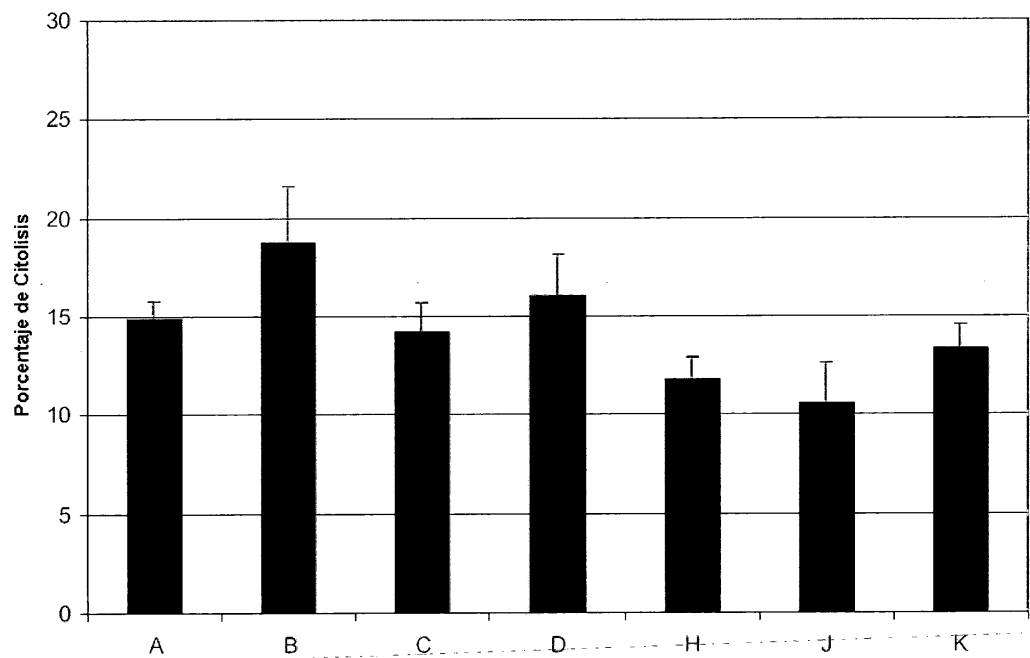


Fig. 5

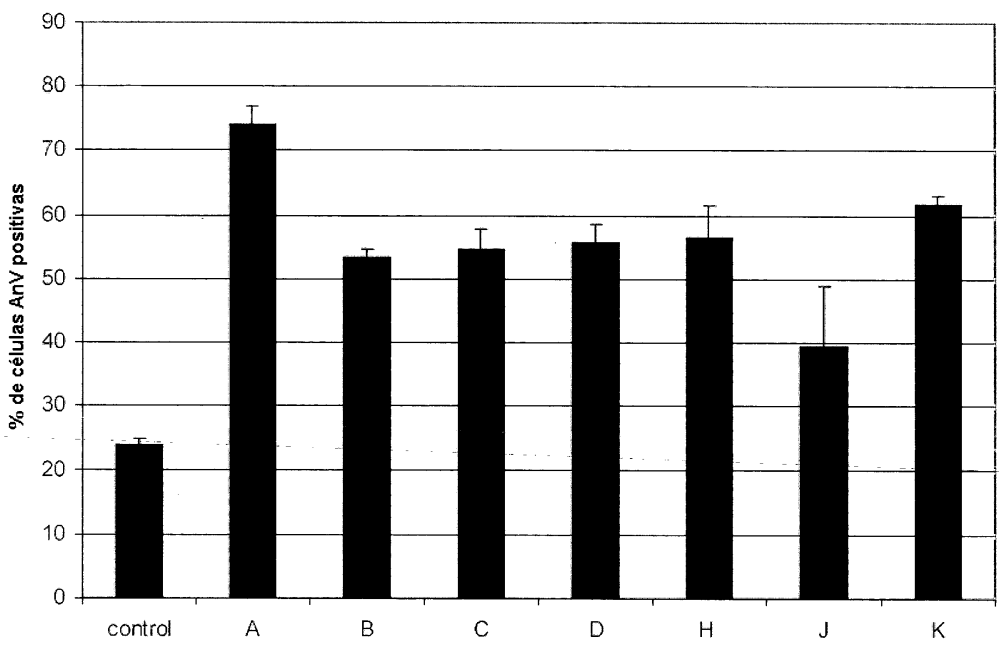


Fig. 6

Fig. 7

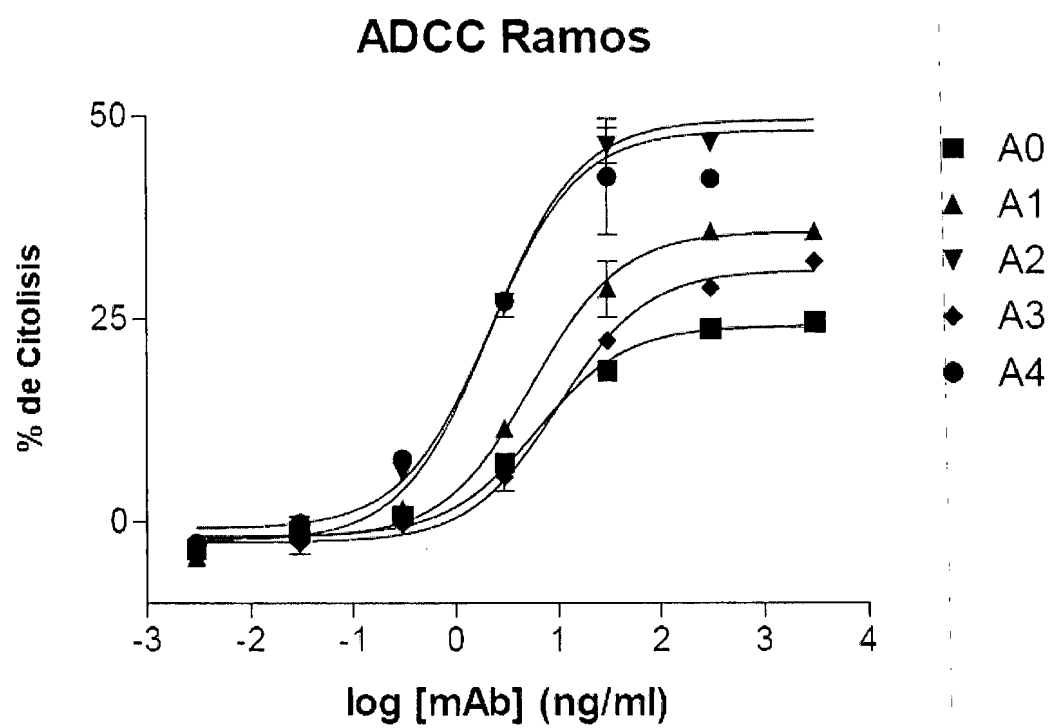
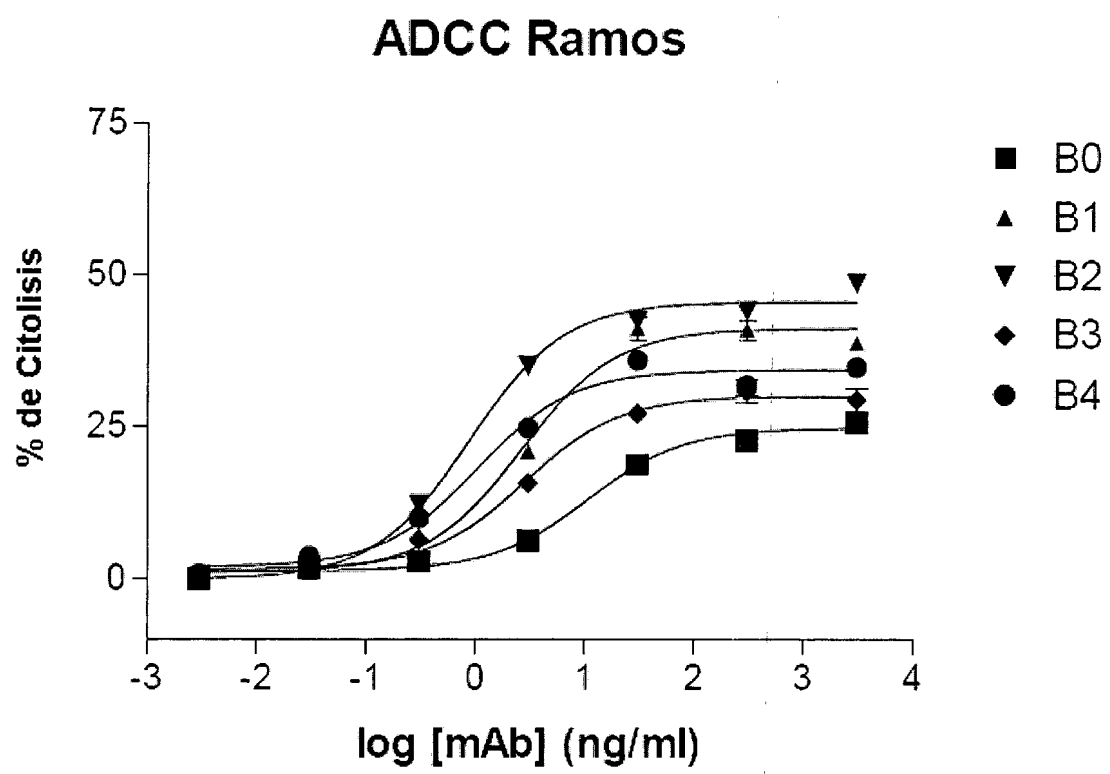


Fig. 8



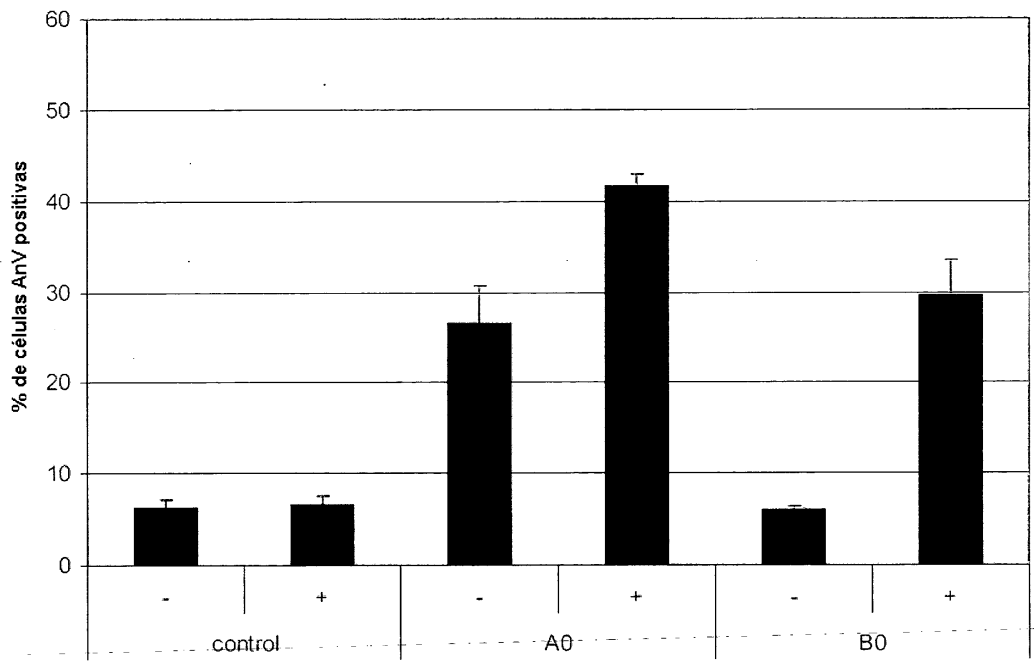
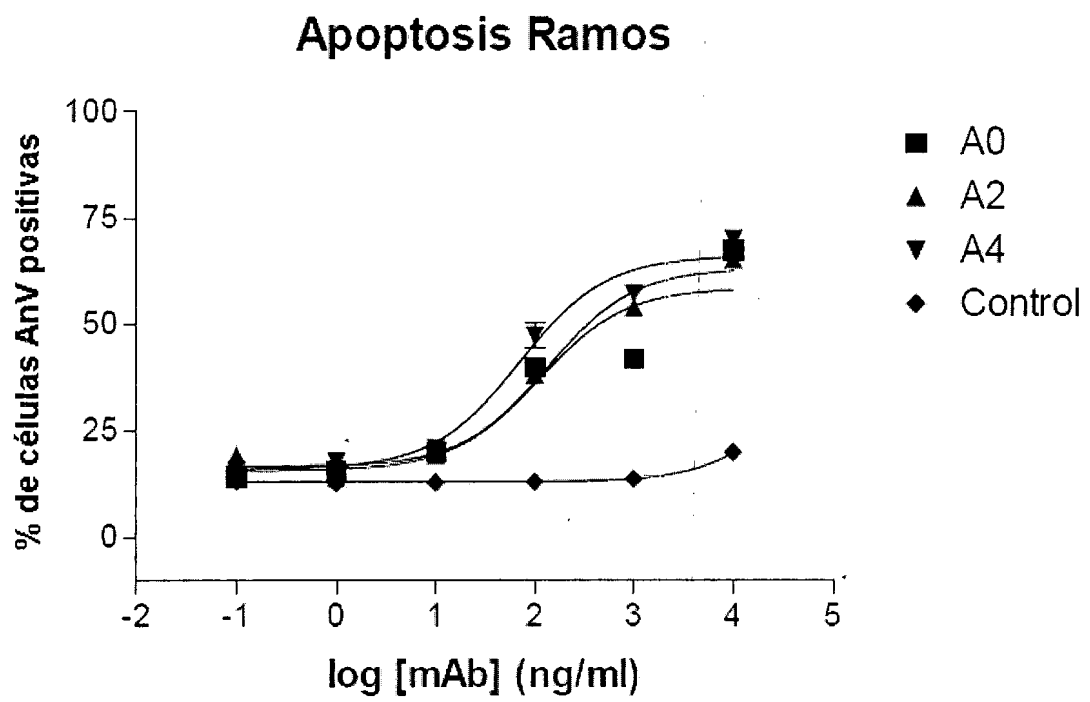


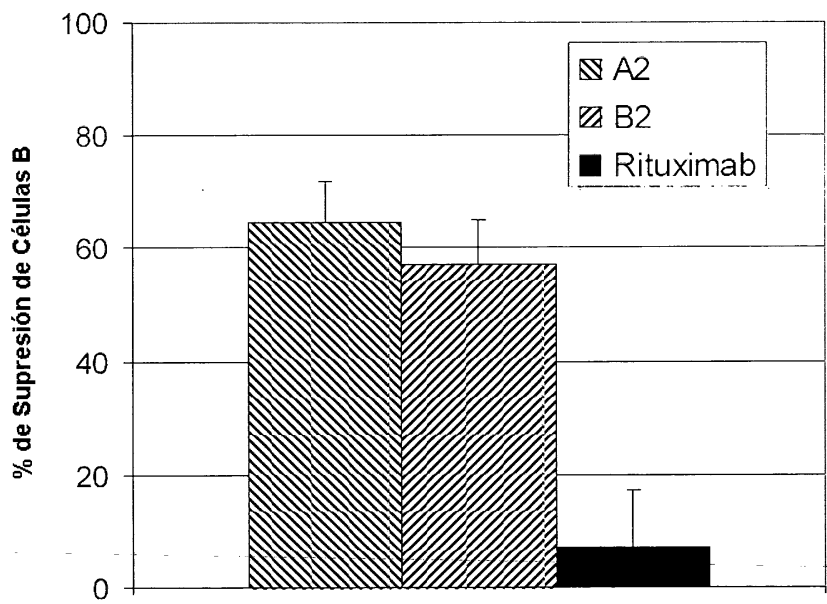
Fig. 9

Fig. 10



ASAP
P12-0278-PCT

Fig. 11A



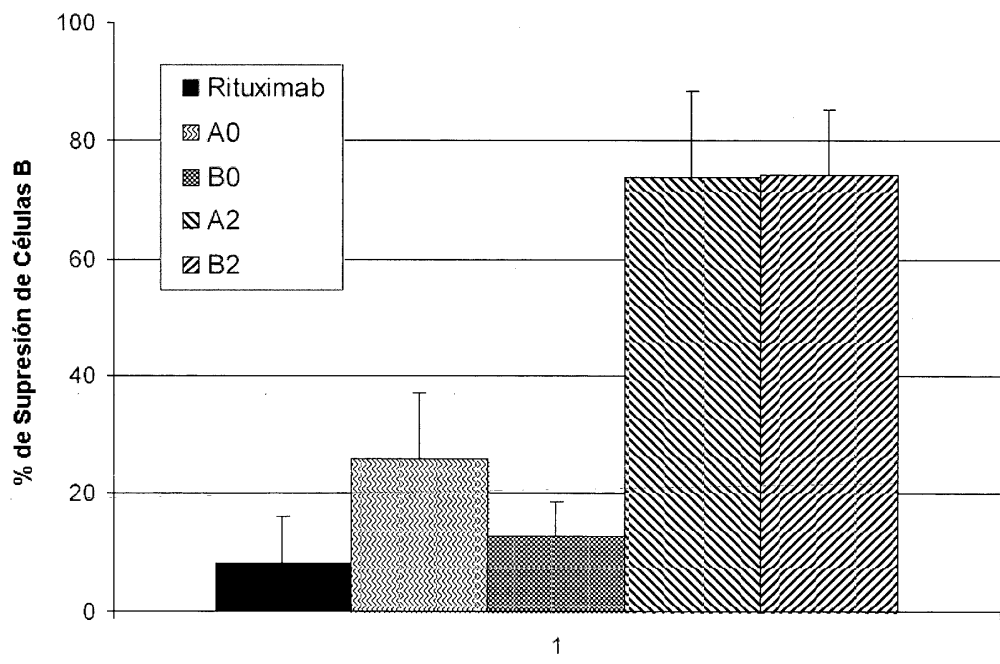
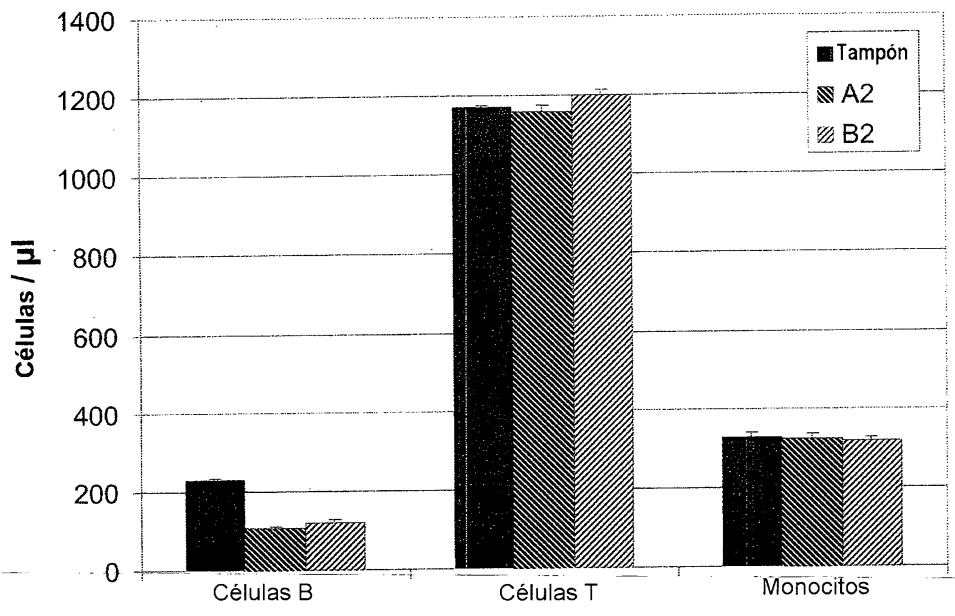


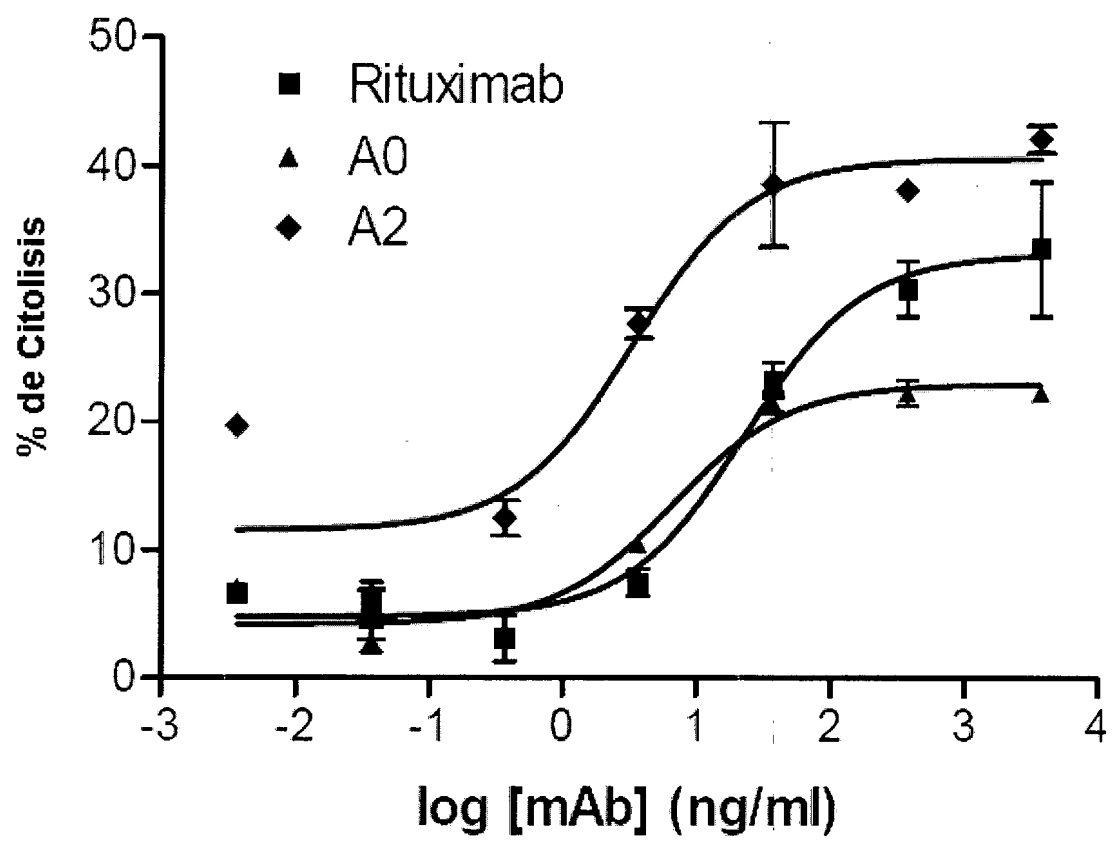
Fig. 11B

Fig. 11C



P12-0278-PCR
AS#

Fig. 12



Handwritten signature and initials.

Fig. 13

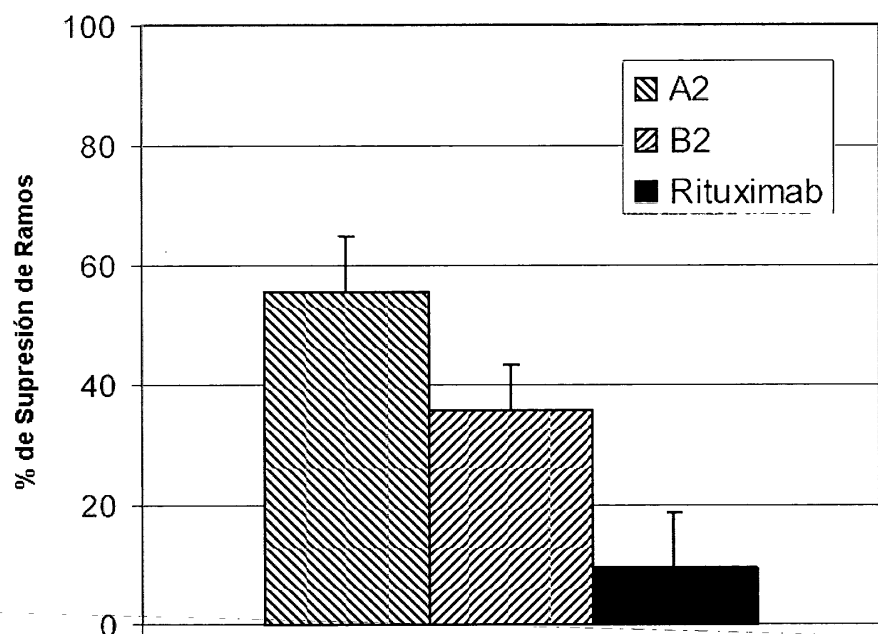
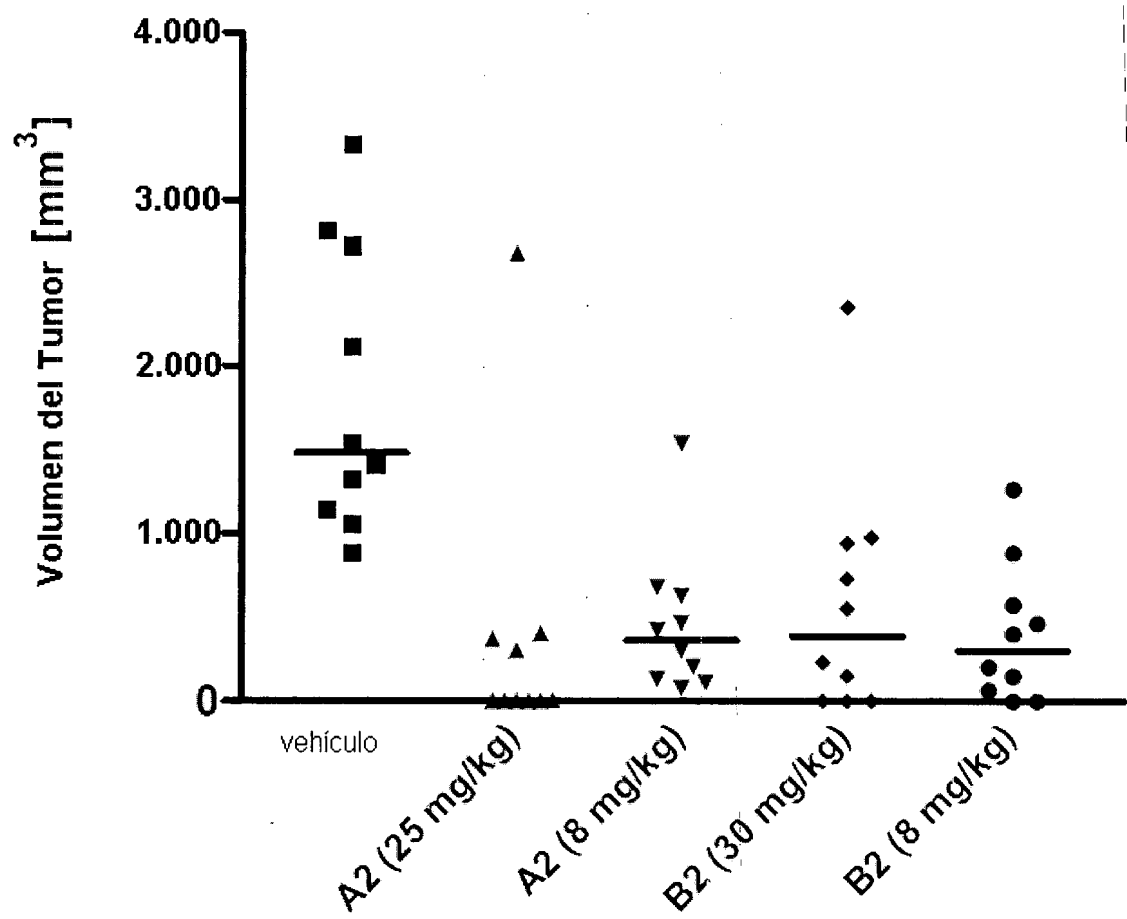


Fig. 14



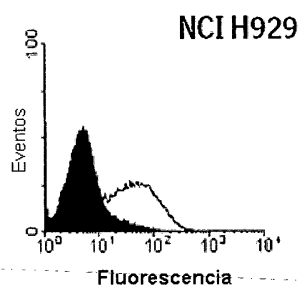
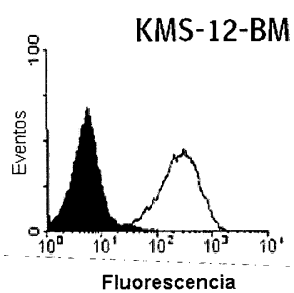
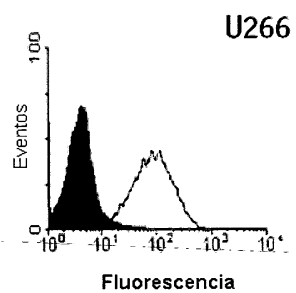
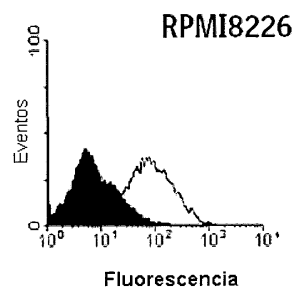
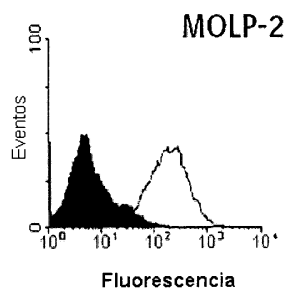
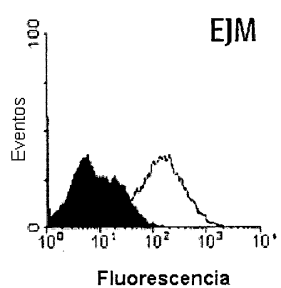
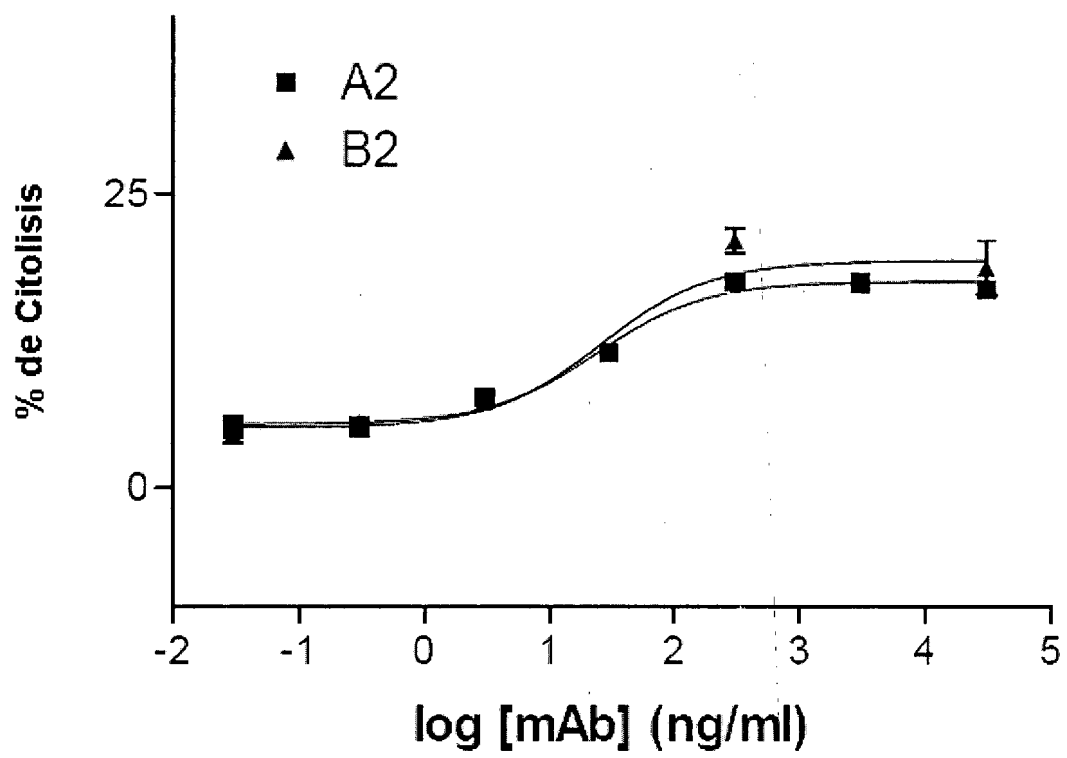


Fig. 15

46
SA

Fig. 16



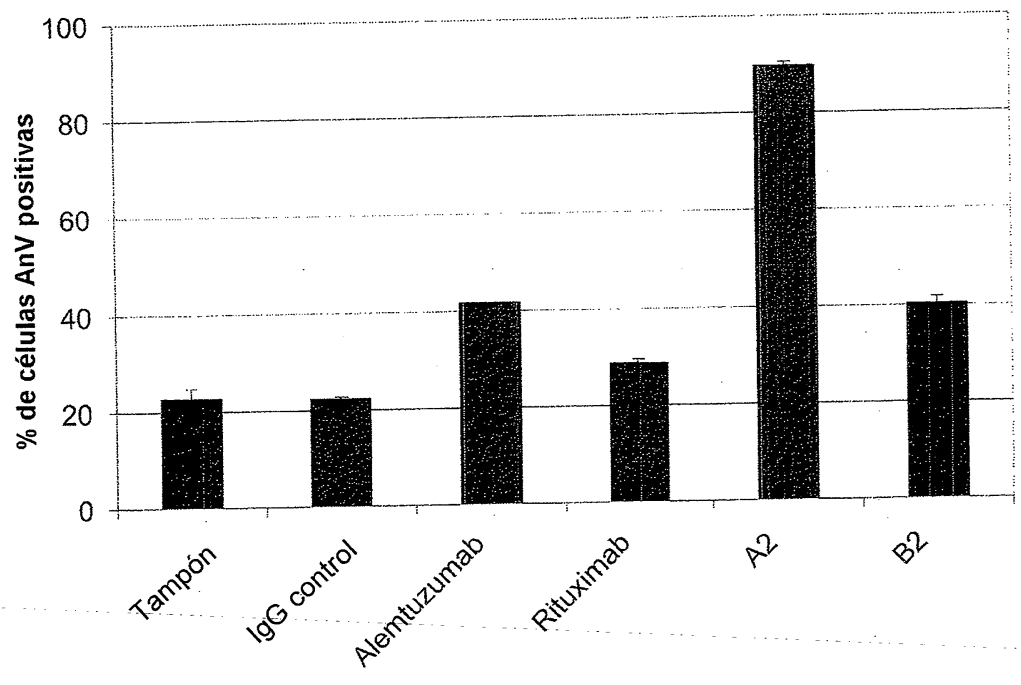


Fig. 17

[Handwritten signatures]

Handwritten marks: "A1" and "89" with a signature.

SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Anti-CD37 Antibodies

<130> 12_0278_PCT

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(348)

<400> 1

gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct	48
Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr	
20 25 30	

aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att	144
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	

gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc	192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe	
50 55 60	

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt	288
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	

gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc	336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val	
100 105 110	

acc gtc tct tct	348
Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 324
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 3
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat 96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30
ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45
tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg 288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

19-80
50

acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

324

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

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

<210> 5
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)

<400> 5

gcc gtg cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

48

agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

96

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

144

ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc	192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe	
50 55 60	

aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac	240
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc	336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
100 105 110	

acc gtc tct tca	348
Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 6
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 6

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

50-61
51

<210> 7
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)

<400> 7
gcc gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc ggc 48
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
agc ctg aga ctg agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg 144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc 192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60
aag ggc agg gcc acc ctg agc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc 336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
acc gtc tct tca 348
Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 8
Ala 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 Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)

<400> 9
gcc gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc ggc 48
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
agc ctg aga ctg agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg 144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
gcc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag gtc 192
Ala Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Val
50 55 60
aag ggc agg ttc acc atc agc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc 336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

12
8/52

acc gtc tct tca
Thr Val Ser Ser
115

348

<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 10

Ala 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 Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Ala Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 11

gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

48

gac	cgg	gtg	acc	atc	acc	tgc	cgg	acc	agc	gag	aac	gtg	tac	agc	tac	96
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asn	Val	Tyr	Ser	Tyr	
			20					25					30			

ctg	gcc	tgg	tat	cag	cag	aag	ccc	ggc	aag	gcc	ccc	aag	ctg	ctg	gtg	144
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Val	
			35				40					45				

tcc	ttc	gcc	aag	acc	ctg	gcc	gag	ggc	gtg	ccc	agc	cgg	ttt	agc	ggc	192
Ser	Phe	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50					55					60					

agc	ggc	tcc	ggc	acc	gac	ttc	acc	ctg	acc	atc	agc	agc	ctg	cag	ccc	240
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
65					70					75					80	

gag	gac	ttc	gcc	acc	tac	ttt	tgc	cag	cac	cac	agc	gac	aac	ccc	tgg	288
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	His	Ser	Asp	Asn	Pro	Trp	
				85					90					95		

acc	ttc	ggc	cag	ggc	acc	aag	gtg	gag	atc	aaa	cgt					324
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg					
			100					105								

<210> 12
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 12

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asn	Val	Tyr	Ser	Tyr
			20					25					30		

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

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

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

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	His	Ser	Asp	Asn	Pro	Trp
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105							

<210> 13

3363
R

<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 13
gac atc gtg atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg gtc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30
ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc gcc aag gcc ccc aag ctg ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agc ggc tcc gcc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95
acc ttc gcc cag gcc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

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

50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
	100	105	
<210> 15			
<211> 324			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(324)			
<400> 15			
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc			48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac			96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr			
	20	25	30
ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg			144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val			
	35	40	45
tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc			192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
agc ggc tcc ggc acc cag ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc			240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg			288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp			
	85	90	95
acc ttc ggc gga ggc acc gag ctg gag atc aaa cgt			324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg			
	100	105	
<210> 16			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Synthetic Construct			

54
53
64

<400> 16

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

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

<210> 17

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 17

gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct ggc 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag gcc ccc aga ctg ctg gtg 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc gcc agg ttt agc ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 19
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 19
gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct ggc 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

65# 5

gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg gtc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag gcc ccc aga ctg ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc gcc agg ttt agc ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 20

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 21

<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 21
gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct ggc 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc gcc cag gcc ccc aga ctg ctg gtg 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc gcc agg ttt agc ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agc ggc tcc ggc acc cag ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

acc ttc ggc gga ggc acc gag ctg gag atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 22
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

56#
88

50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

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

<210> 23
<211> 990
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(990)

<400> 23

gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag 288
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc 336
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca 384
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc 432
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg 480
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag	528
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
165 170 175	
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg	576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
180 185 190	
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac	624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
195 200 205	
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg	672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
210 215 220	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag	720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	
225 230 235 240	
atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat	768
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
245 250 255	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac	816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
260 265 270	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc	864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
275 280 285	
ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac	912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
290 295 300	
gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg	960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
305 310 315 320	
cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa	990
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
325 330	

<210> 24
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

57
#67

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 25
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(318)

<400> 25
act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 48
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 96
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg 144
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc 192
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 240
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 288
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95
gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 318
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

8768

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 27
<211> 1338
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fc-engineered chimeric immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 27

gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct 48
Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att 144
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc 192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc 336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca 384
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu 130 135 140	432
gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 145 150 155 160	480
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 165 170 175	528
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190	576
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205	624
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220	672
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg gac gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240	720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255	768
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270	816
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285	864
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300	912
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320	960
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335	1008
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350	1056
tcc ccg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365	1104
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380	1152
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac	1200

6789
58

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

ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa 1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 28

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
			180					185					190			
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		195					200					205				
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
	210					215					220					
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	Val	Phe	
225					230					235					240	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				245					250					255		
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
			260					265					270			
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
		275					280					285				
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
	290					295					300					
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
305					310					315					320	
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
				325					330					335		
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
			340					345					350			
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
		355					360					365				
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
	370					375					380					
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	
385					390					395					400	
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
				405					410					415		

1028
59

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 29
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chimeric immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(642)

<400> 29
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat 96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30
ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45
tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg 288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95
acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca 336
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga 384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc 528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

	165	170	175	
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac				576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr				
	180	185	190	
gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc				624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser				
	195	200	205	
ttc aac agg gga gag tgt				642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys				
	210			
<210> 30				
<211> 214				
<212> PRT				
<213> Artificial				
<220>				
<223> Synthetic Construct				
<400> 30				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly				
1 5 10 15				
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr				
20 25 30				
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val				
35 40 45				
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly				
50 55 60				
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro				
65 70 75 80				
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp				
85 90 95				
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala				
100 105 110				
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly				
115 120 125				
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala				
130 135 140				
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln				
145 150 155 160				

61-71
60

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31
<211> 1338
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fc-engineered chimeric immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 31	
gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct	48
Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr	
20 25 30	
aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att	144
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc	192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt	288
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc	336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val	
100 105 110	
acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca	384
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala	
115 120 125	
ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg	432
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu	

130	135	140	
gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 145 150 155 160			480
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 165 170 175			528
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190			576
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205			624
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220			672
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg gcg gga ccg gat gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240			720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255			768
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270			816
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285			864
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300			912
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320			960
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335			1008
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350			1056
tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365			1104
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380			1152
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385 390 395 400			1200

ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa 1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 32
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 32

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190		
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205		
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220		
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240		
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255		
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270		
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285		
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300		
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320		
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335		
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350		
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365		
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380		
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385 390 395 400		
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 405 410 415		
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 420 425 430		

63 73
62

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 33
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chimeric immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(642)

<400> 33
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat 96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30
ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45
tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg 288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95
acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca 336
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga 384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc 528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac 576

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

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

ttc aac agg gga gag tgt 642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 34

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

84 74
63

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 35
<211> 1338
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fc-engineered humanized immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 35
gcg gtc cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc 48
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg 144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc 192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc 336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca 384
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg 432
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc	480
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly	
145 150 155 160	
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca	528
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser	
165 170 175	
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg	576
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu	
180 185 190	
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc	624
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr	
195 200 205	
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca	672
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr	
210 215 220	
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg gac gtc ttc	720
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe	
225 230 235 240	
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc ccg acc cct	768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	
245 250 255	
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc	816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val	
260 265 270	
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca	864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	
275 280 285	
aag ccg ccg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc	912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	
290 295 300	
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc	960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	
305 310 315 320	
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc	1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser	
325 330 335	
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca	1056
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	
340 345 350	
tcc ccg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc	1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	
355 360 365	
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg	1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	
370 375 380	
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac	1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	
385 390 395 400	

65-75
69

ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa 1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 36
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 36

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

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

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

66
26#

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 37
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(642)

<400> 37
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca 336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga 384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc 528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac	576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
180 185 190	

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc	624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
195 200 205	

ttc aac agg gga gag tgt	642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210	

<210> 38
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

67#
66

	165		170		175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr						
	180		185		190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser						
	195		200		205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys						
	210					
<210>	39					
<211>	1338					
<212>	DNA					
<213>	Artificial					
<220>						
<223>	Fc-engineered humanized immunoglobulin sequence					
<220>						
<221>	CDS					
<222>	(1)..(1338)					
<400>	39					
gcg gtc cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc						48
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser						
1 5 10 15						
agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac						96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr						
20 25 30						
aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg						144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met						
35 40 45						
ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc						192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe						
50 55 60						
aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac						240
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr						
65 70 75 80						
atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc						288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys						
85 90 95						
gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc						336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val						
100 105 110						
acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca						384
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala						
115 120 125						
ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg						432
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu						
130 135 140						

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 145 150 155 160	480
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 165 170 175	528
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190	576
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205	624
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220	672
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg gcg gga ccg gat gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240	720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255	768
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270	816
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285	864
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300	912
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320	960
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335	1008
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350	1056
tcc ccg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365	1104
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380	1152
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385 390 395 400	1200

ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa 1338
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 40
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 40

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190		
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205		
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220		
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240		
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255		
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270		
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285		
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300		
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320		
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335		
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350		
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365		
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380		
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385 390 395 400		
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 405 410 415		
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 420 425 430		

69
~~68~~
29

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 41
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(642)

<400> 41
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30
ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45
tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95
acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca 336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga 384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc 528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac 576

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

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

ttc aac agg gga gag tgt 642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 42
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 42

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

20
69
25

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210