



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 304 786**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**C12N 5/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96913247 .1**

86 Fecha de presentación : **29.04.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0822830**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.1998**

54

Título: **Anticuerpos anti-IL-8 humanos, derivados a partir de xenoratos inmunizados.**

30

Prioridad: **27.04.1995 US 430938**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2008**

73

Titular/es: **Amgen Fremont Inc.**  
**6701 Kaiser Drive**  
**Fremont, California 94555, US**

72

Inventor/es: **Kucherlapati, Raju;**  
**Jakobovits, Aya;**  
**Klapholz, Sue;**  
**Brenner, Daniel, G. y**  
**Capon, Daniel, J.**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 304 786 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-IL-8 humanos, derivados a partir de xenoratonos inmunizados.

### 5 Campo técnico

La invención se refiere al campo de la inmunología, y en particular a la producción de anticuerpos. Más específicamente, se refiere a la producción de anticuerpos anti-IL-8 por un procedimiento que incluye la etapa de inmunizar un animal transgénico con un antígeno para el cual los anticuerpos son deseados. El animal transgénico ha sido así modificado para producir anticuerpos, a diferencia de endógenos, humanos.

### Antecedentes de la técnica

La solicitud PCT WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994 describe detalladamente la producción de animales transgénicos no humanos que son modificados para producir anticuerpos totalmente humanos más bien que anticuerpos endógenos en respuesta a la exposición antigénica. Brevemente, los *loci* endógenos que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina están incapacitados en los huéspedes transgénicos y los *loci* que codifican proteínas de cadena pesada y ligera humana son insertados en el genoma. En general, el animal que proporciona todas las modificaciones deseadas es obtenido cruzando animales intermedios que contienen menos que el complemento entero de modificaciones. La realización preferida del animal no humano descrito en la memoria descriptiva es un ratón. Así, los ratones, específicamente, se describe que, cuando son administrados los inmunógenos, producen anticuerpos con regiones variables humanas, incluyendo anticuerpos totalmente humanos, más bien que anticuerpos murinos que son inmuno-específicos para estos antígenos.

La disponibilidad de tales animales transgénicos hace posible nuevos enfoques para la producción de anticuerpos totalmente humanos. Los anticuerpos con varias inmuno-especificidades son deseables para el uso terapéutico y diagnóstico. Los anticuerpos pretendidos para su uso terapéutico en humanos y diagnóstico *in vivo*, en particular, han sido problemáticos porque las fuentes de la técnica anterior para tales anticuerpos causaban una inmunoglobulina que tenía las estructuras características de los anticuerpos producidos por huéspedes no humanos. Tales anticuerpos tienden a ser inmunogénicos cuando se usan en seres humanos.

La disponibilidad de los animales transgénicos sensibles a inmunógenos no humanos, descritos en dicho documento WO 94/02602 hace posible la producción conveniente de anticuerpos humanos sin necesidad de emplear a huéspedes humanos.

### 35 Descripción de la invención

La invención se refiere a anticuerpos anti-IL-8 según se definen en las reivindicaciones.

Se describe un método para producir una inmunoglobulina totalmente humana frente a un antígeno específico o para producir un análogo de dicha inmunoglobulina por un procedimiento que comprende inmunizar un animal no humano con el antígeno en las condiciones que estimulan una respuesta inmune. El animal no humano está caracterizado por ser sustancialmente incapaz de producir la cadena de inmunoglobulina pesada o ligera endógena, pero que es capaz de producir la inmunoglobulina tanto con regiones humanas variables como con constantes. En la respuesta resultante inmune, el animal produce células B que secretan una inmunoglobulina que es totalmente humana y específica para el antígeno. La inmunoglobulina humana de especificidad deseada puede ser repuesta directamente al animal, por ejemplo, a partir de suero, o pueden ser obtenidas células B primarias a partir del animal y ser immortalizadas. Las células B immortalizadas pueden ser usadas directamente como una fuente de anticuerpos humanos o, de forma alternativa, pueden prepararse genes que codifican los anticuerpos a partir de células B immortalizadas o a partir de células B primarias de la sangre o a partir de tejido linfoide (bazo, amígdalas, nodos de linfa, médula ósea) del animal inmunizado y ser expresadas en huéspedes recombinantes, con o sin modificaciones, para producir la inmunoglobulina o sus análogos. Además, los genes que codifican el repertorio de inmunoglobulina producida por el animal inmunizado pueden ser usados para generar una genoteca de inmunoglobulina para permitir al rastreo de aquellas regiones variables que proporcionan la afinidad deseada. Los clones de la genoteca que tienen las características deseadas entonces pueden ser usados como una fuente de secuencias de nucleótidos que codifican las regiones variables deseadas para una posterior manipulación para generar anticuerpos o análogos con estas características usando técnicas recombinantes estándar.

Una línea de células B no humana immortalizada derivada a partir del animal anteriormente descrito es descrita. En otro aspecto más, la invención se refiere a una célula huésped recombinante que es modificada para contener el gen que codifica la inmunoglobulina humana definida en las reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

65 La figura 1 es una representación esquemática de la construcción de la cadena pesada YAC humana de yH1C.

La figura 2 es una representación esquemática de la construcción de la cadena ligera  $\kappa$  YAC humana de yK2.

## ES 2 304 786 T3

La figura 3 muestra los títulos en suero de anticuerpos anti-IL-6 de un Xenomouse® inmunizado con IL-6 humano y cuyos anticuerpos contienen cadenas ligeras  $\kappa$  humanas y/o cadenas pesadas  $\mu$  humanas.

La figura 4 muestra los títulos en suero de anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  a partir de un Xenomouse® inmunizado con TNF- $\alpha$  humano y cuyos anticuerpos contienen cadenas ligeras  $\kappa$  humanas y/o cadenas pesadas  $\mu$  humanas.

La figura 5 muestra los títulos en suero de anticuerpos anti-CD4 a partir de un Xenomouse® inmunizado con CD4 humano y cuyos anticuerpos contienen cadenas ligeras  $\kappa$  humanas y/o cadenas pesadas  $\mu$  humanas.

La figura 6 muestra los títulos en suero de un Xenomouse® inmunizado con células 300.19 que expresan L-selectina en su superficie.

En el ensayo ELISA usado, estos anticuerpos son detectables si llevan las cadenas pesadas de la región constante  $\mu$  humana.

La figura 7 muestra los títulos en suero de un Xenomouse® inmunizado con células 300.19 que expresan L-selectina en su superficie.

En el ensayo ELISA usado, estos anticuerpos son detectables sólo si llevan cadenas ligeras  $\kappa$  humanas.

La figura 8 muestra un análisis FACS de neutrófilos humanos incubados con el suero de un Xenomouse® inmunizado con L-selectina humana y marcado con un anticuerpo inmuno-reactivo con la región  $\kappa$  de la cadena ligera humana.

La figura 9 muestra un diagrama de un plásmido usado para transfectar células de mamífero para provocar la producción de la proteína humana gp39.

La figura 10 representa la curva de titulación en suero del ratón inmunizado con células CHO que expresan gp39 humano. Los anticuerpos detectados en este ELISA deben ser inmuno-reactivos con gp39 y contener las regiones constantes  $\mu$  humana de la cadena pesada y cadenas ligeras  $\kappa$  humanas.

La figura 11 es una curva de titulación respecto a anticuerpos monoclonales secretados por el clon del hibridoma D5.1. Este clon es obtenido a partir de un Xenomouse® inmunizado con la toxina C del tétano (TTC) y contiene la región constante de la cadena ligera  $\kappa$  humana y  $\mu$  humana en la cadena pesada.

Figura 12. Secuencia de ADN de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de la toxina anti-tétano D5.1.4 (un subclon de D5.1). Se encuadran las mutaciones de la línea germinal.

Figura 13. Secuencia de ADN de la cadena ligera  $\kappa$  del anticuerpo monoclonal de la toxina anti-tétano D5.1.4. Se encuadran las mutaciones de la línea germinal.

La figura 14 muestra los títulos en suero de los anticuerpos anti-IL-8 del Xenomouse® inmunizado con IL-8 humano y cuyos anticuerpos contienen cadenas ligeras  $\kappa$  humanas y/o cadenas pesadas  $\mu$  humanas.

Figura 15. Inhibición de la unión de IL-8 a neutrófilos humanos mediante anticuerpos monoclonales anti-humano-IL-8.

Figura 16 (A-H). Secuencias de ADN de la cadena pesada y la cadena ligera  $\kappa$  de los anticuerpos anti-IL-8 D1.1 (16A-B), K2.2 (16C-D), K4.2 (16E-F), y K4.3 (16G-H).

### Modos de llevar a cabo la invención

En general, se describen métodos que incluyen administrar un antígeno para el cual son deseadas formas humanas de reactivos inmunospecíficos a un animal transgénico no humano que ha sido modificado genéticamente para ser capaz de producir anticuerpos humanos, a diferencia de endógenos. Típicamente el animal ha sido modificado para inutilizar los *loci* de cadena pesada y/o ligera endógena en su genoma, de modo que estos *loci* endógenos son incapaces de la reposición requerida para generar genes que codifican inmunoglobulinas en respuesta a un antígeno. Además, al animal le habrá sido proporcionado, establemente, en su genoma, al menos un *locus* de cadena pesada humana y al menos un *locus* de cadena ligera humana de modo que en respuesta a un antígeno administrado, los *loci* humanos puedan reorganizarse para proporcionar genes que codifican regiones variables humanas inmunospecíficas para el antígeno.

Los detalles para construir tal animal útil en el método de la invención son proporcionados en la solicitud PCT WO 94/02602 mencionada anteriormente. Los ejemplos de los YAC para la presente invención pueden ser encontrados, por ejemplo, en Green *et al.*, *Nature Genetics* 7:13-21 (1994). En una realización preferida del Xenomouse® son usados el YAC de cadena pesada humana, yH1C (1020 kilobytes), y el YAC de cadena ligera humana, yK2 (880 kilobytes). yH1C está comprendido de 870 kb de la región variable humana, la región D entera y J<sub>H</sub>, regiones constantes  $\mu$ ,  $\delta$ , y  $\gamma$ 2 humanas y el potenciador 3' de ratón. yK2 está comprendido de 650 kb de la región variable proximal de la cadena  $\kappa$  humana (V $\kappa$ ), la región entera J $\kappa$ , y C $\kappa$  con sus secuencias flanqueantes que contiene el elemento de delección

$\kappa$  ( $\kappa$ de). Ambos YAC también contienen un marcador seleccionable de HPRT humano en su brazo del vector de YAC. La construcción de yH1C e yK2 fue lograda por métodos conocidos en la técnica. Brevemente, los clones de YAC que llevan segmentos de los *loci* de inmunoglobulina humana fueron identificados rastreando una genoteca de YAC (Calbertsen *et al.*, *PNAS* **87**:4256 (1990)). Los clones que traslapaban fueron unidos por recombinación usando técnicas estándar (Mendez *et al.*, *Genomics* **26**:294-307 (1995)). Se muestran los detalles de los esquemas para ensamblar yH1C y yK2 en la Figura 1 y la Figura 2 respectivamente.

YK2 fue construido a partir de los clones A80-C7, A210-F10 y A203-C6 de la genoteca Olson, descrito, por ejemplo, en Burke *et al.*, *Science* **236**:806-812 (1987), Brownstein *et al.*, *Science* **244**:1348-1351 (1989), y Burke *et al.*, *Methods in Enzymology* **194**:251-270 (1991).

Para la producción de los anticuerpos deseados, la primera etapa es la administración del antígeno. Las técnicas para tal administración son convencionales e implican protocolos de inmunización adecuados y formulaciones que dependerán de la naturaleza propia del antígeno. Puede ser necesario proveer al antígeno de un vehículo para realzar su inmunogenicidad y/o incluir formulaciones que contengan adyuvantes y/o administrar inyecciones múltiples y/o variar la ruta de la inmunización y similares. Tales técnicas son estándar y la optimización de ellas dependerá de las características del antígeno particular para el cual son deseados los reactivos inmuno-específicos.

Como se usa en este documento, la expresión “reactivos inmuno-específicos” incluye inmunoglobulinas y sus análogos. El término “análogos” tiene un significado específico en este contexto. Se refiere a restos que contienen las partes totalmente humanas de inmunoglobulina que cuentan para su inmunoespecificidad. En particular, se requieren regiones variables incluyendo regiones determinantes de la complementariedad (CDR), junto con las partes suficientes de las regiones marco (FR) para proporcionar la conformación tridimensional apropiada. Los análogos inmuno-específicos típicos de anticuerpos incluyen las regiones F(ab')<sub>2</sub>, Fab' y Fab. Se conocen formas modificadas de las regiones variables para obtener, por ejemplo, análogos de F<sub>v</sub> de la cadena sencilla con la inmunoespecificidad apropiada. Una revisión de tal construcción de F<sub>v</sub> es encontrada, por ejemplo, en Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* **203**:46-63 (1991). La construcción de análogos de anticuerpo con múltiple inmunoespecificidades es también posible acoplando las regiones variables de un anticuerpo a las del segundo anticuerpo.

Las regiones variables con características totalmente humanas también pueden ser acopladas a una variedad de sustancias adicionales que pueden proporcionar toxicidad, funcionalidad biológica, especificidades de unión alternativas y similares. Los restos que incluyen las regiones variables totalmente humanas producidas por los métodos de la invención incluyen proteínas de fusión de cadena simple, moléculas acopladas por métodos covalentes distintos a los que implican enlaces peptídicos y moléculas agregadas. Los ejemplos de análogos que incluyen regiones variables acopladas a moléculas adicionales covalentemente o no covalentemente incluyen los de la siguiente lista ilustrativa no limitante. Trauneker, A. *et al.*, *Int J Cancer Supp* (1992) Sup. **7**:51-52 describe al reactivo biespecífico janusin en el cual la región F<sub>v</sub> dirigida a CD3 es acoplada a CD4 soluble o a otros ligandos tales como OVCA e IL-7. Asimismo, las regiones variables totalmente humanas producidas por el método de la invención pueden ser construidas en moléculas F<sub>v</sub> y acopladas a ligandos alternativos tales como los ilustrados en el artículo citado. Higgins, P. J. *et al.* *J Infect Disease* (1992) **166**:198-202 describen un anticuerpo heteroconjugado compuesto de OKT3 reticulado a un anticuerpo dirigido a una secuencia específica en la región V3 o GP120. Tales anticuerpos heteroconjugados también pueden ser contruidos usando al menos las regiones variables humanas contenidas en las inmunoglobulinas producidas por los métodos de la invención. Los ejemplos adicionales de anticuerpos biespecíficos incluyen los descritos por Fanger, M. W. *et al.*, *Cancer Treat Res.* (1993) **68**: 181-194 y por Fanger, M. W. *et al.*, *Crit Rev Immunol* (1992) **12**: 101-124. Conjugados que son inmunotoxinas que incluyen anticuerpos convencionales han sido descritos extensamente en la técnica. Las toxinas pueden ser acopladas a los anticuerpos por técnicas de acoplamiento convencionales o las inmunotoxinas que contienen partes de toxina de proteína pueden ser producidas como proteínas de fusión. Los análogos de la presente invención pueden ser usados de un modo correspondiente para obtener tales inmunotoxinas. Ilustrativo de tales inmunotoxinas son las descritas por Byers, B. S. *et al.*, *Seminars Cell Biol* (1991) **2**:59-70 y por Fanger, M. W. *et al.* *Immunol Today* (1991) **12**:51-54.

Las inmunoglobulinas y análogos pueden tener actividad agonista con respecto a los antígenos para los cuales son inmuno-específicos en los casos en los que los antígenos realizan funciones de transducción de la señal. Así, un subconjunto de anticuerpos o análogos preparados de acuerdo con los métodos descritos que son inmuno-específicos para, por ejemplo, un receptor de la superficie celular, será capaz de obtener una respuesta de células que llevan este receptor correspondiente al obtenido por el ligando natural. Además, los anticuerpos o los análogos que son inmuno-específicos para sustancias que imitan los estados de transición de reacciones químicas tendrán actividad catalítica.

Brevemente, los genes que codifican las inmunoglobulinas producidas por los animales transgénicos de la invención pueden ser recuperados y las secuencias de nucleótidos que codifican la región variable totalmente humana pueden ser manipuladas de acuerdo con técnicas conocidas para proporcionar una variedad de análogos tales como los descritos anteriormente. Además, las propias inmunoglobulinas que contienen las regiones variables humanas pueden ser modificadas usando técnicas de acoplamiento estándar para proporcionar conjugados que conservan regiones inmuno-específicas.

Así, los “análogos” de inmunoglobulina se refieren a los restos que contienen aquellas partes de los anticuerpos de la invención que conservan sus características humanas y su inmunoespecificidad. Estos conservarán regiones variables suficientemente humana para proporcionar la especificidad deseada.

## ES 2 304 786 T3

Se describen métodos que incluyen administrar el antígeno apropiado al animal transgénico. La recuperación o la producción de los propios anticuerpos puede ser alcanzada de varios modos.

Primero, y el más directo, los anticuerpos policlonales producidos por el animal y secretados en la corriente sanguínea pueden ser recuperados usando técnicas conocidas. Las formas purificadas de estos anticuerpos, por supuesto, pueden ser fácilmente preparadas por técnicas de purificación estándar, incluyendo preferiblemente la cromatografía de afinidad con proteína A, anti-inmunoglobulina o el antígeno particular. En cualquier caso, para controlar el éxito de la inmunización, los niveles de anticuerpo con respecto al antígeno en suero serán controlados usando técnicas estándar tales como ELISA, RIA y similares.

Para algunas aplicaciones sólo se requieren las regiones variables de los anticuerpos. El tratamiento del antisuero policlonal con reactivos adecuados para generar las partes Fab', Fab, o F(ab'')<sub>2</sub> causan composiciones que conservan características totalmente humanas. Tales fragmentos son suficientes para uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que implican el acoplamiento de las partes inmunes específicas de inmunoglobulinas para detectar reactivos tales como radioisótopos.

De forma alternativa, las inmunoglobulinas y los análogos con características deseadas pueden ser generados a partir de células B inmortalizadas derivadas a partir de los animales transgénicos usados en el método de la invención o a partir de genes reorganizados proporcionados por estos animales en respuesta a la inmunización.

Así, como una alternativa a la recolección de los anticuerpos directamente del animal, pueden ser obtenidas células B, típicamente del bazo, pero también, de ser deseado, a partir de los linfocitos de sangre periférica o nodos de linfa y ser inmortalizadas usando cualquiera de una variedad de técnicas, más comúnmente usando los métodos de fusión descritos por Kohler y Milstein, Nature. 245: 495 (1975). Los hibridomas resultantes (o, de otra manera, células B inmortalizadas) pueden ser cultivados entonces como colonias individuales y ser seleccionados por la secreción de los anticuerpos de especificidad deseada. Como se describe anteriormente, la selección también puede incluir una confirmación del carácter totalmente humano del anticuerpo. Por ejemplo, como se describe en los ejemplos debajo, puede ser empleado un ELISA tipo sándwich en el que el monoclonal en el sobrenadante del hibridoma es unido tanto al antígeno como a una región constante antihumana. Después de que los hibridomas apropiados sean seleccionados, los anticuerpos deseados pueden ser recuperados, de nuevo usando técnicas convencionales. Pueden prepararse en cantidad por el cultivo de las células B inmortalizadas usando métodos convencionales, *in vitro*, o *in vivo* para producir el fluido ascítico. La purificación de las preparaciones del anticuerpo monoclonal resultante es menos pesada que en el caso del suero ya que cada colonia inmortalizada secretará sólo un tipo individual de anticuerpo. En cualquier caso, pueden ser empleadas técnicas de purificación estándar para aislar el anticuerpo de otras proteínas en el medio de cultivo.

Como una alternativa para la obtención de inmunoglobulinas humanas directamente a partir del cultivo de células B inmortalizadas derivadas del animal, las células inmortalizadas pueden ser usadas como una fuente de *loci* de la cadena pesada y la cadena ligera reorganizados para la expresión subsecuente y/o la manipulación genética. Los genes del anticuerpo reorganizados pueden ser sometidos a transcripción inversa a partir de los mRNA apropiados para producir el cADN. Si se desea, la región constante de la cadena pesada puede ser intercambiada por la de un isotipo diferente o pueden ser eliminadas conjuntamente. Las regiones variables pueden ser unidas para codificar las regiones de F<sub>v</sub> de cadena simple. Múltiples regiones de F<sub>v</sub> pueden ser unidas para conferir la capacidad de unión a más de una diana o pueden ser empleadas combinaciones quiméricas de cadena pesada y ligera. Una vez que el material genético está disponible, el diseño de análogos como se describe anteriormente que conservan tanto su capacidad de unirse a la diana deseada, como sus características humanas, es directo.

Una vez que es obtenido el material genético apropiado y, de ser deseado, modificado para codificar un análogo, las secuencias codificantes, incluyendo las que codifican, como mínimo, las regiones variables de la cadena pesada y ligera humana pueden ser insertadas en sistemas de expresión contenidos en vectores que pueden ser transfectados en células huésped recombinantes estándar. Como se describe más abajo, puede ser usada una variedad de tales células huésped; para el procesamiento eficiente, sin embargo, son preferidas las células de mamífero. Líneas celulares de mamífero típicas útiles par este fin incluyen las células CHO, células 293, o células NSO.

La producción del anticuerpo o del análogo entonces es emprendida por el cultivo del huésped recombinante modificado en condiciones de cultivo apropiadas para el cultivo de las células huésped y la expresión de las secuencias de codificación. Los anticuerpos entonces son recuperados a partir del cultivo. Los sistemas de expresión son diseñados preferiblemente para incluir péptidos de señal de modo que los anticuerpos resultantes sean secretados en el medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

Además de deliberar el diseño de formas modificadas de los genes de inmunoglobulina para producir análogos, pueden aprovecharse las técnicas de expresión de fago para proporcionar genotecas que contienen un repertorio de anticuerpos con afinidades que varían para el antígeno deseado. Para la producción de tales repertorios, es innecesario inmortalizar las células B del animal inmunizado; aunque más bien puedan ser usadas las células B primarias directamente como una fuente de ADN. La mezcla de cADN obtenidos a partir de células B, por ejemplo, derivados del bazo, es usada para preparar una genoteca de expresión, por ejemplo, una genoteca de expresión de fago transfectado en *E. coli*. Las células resultantes son analizadas para detectar la inmunoreactividad frente al antígeno deseado. Las técnicas para la identificación de anticuerpos humanos de alta afinidad de tales genotecas son descritas por Griffiths,

A. D., *et al.*, *EMBO J* (1994) **13**:3245-3260; por Nissim, A., *et al. ibid.*, 692-698, y por Griffiths, A. D., *et al.*, *ibid.*, 725-734. En última instancia, son identificados los clones de la genoteca que producen afinidades de unión de una magnitud deseada para el antígeno, y el ADN que codifica el producto responsable de tal unión es recuperado y manipulado para la expresión recombinante estándar. Las genotecas de expresión de fago también pueden ser construidas usando secuencias de nucleótidos previamente manipuladas y seleccionadas de una manera similar. En general, los cADN que codifican la cadena pesada y ligera por separado son suministrados o unidos para formar análogos de F<sub>V</sub> para su producción en la genoteca de fagos.

La genoteca de fagos es así rastreada para seleccionar los anticuerpos con la afinidad más alta para el antígeno y el material genético es recuperado a partir del clon apropiado. Más rondas de rastreo pueden aumentar la afinidad del anticuerpo original aislado. Entonces pueden ser empleadas las manipulaciones descritas anteriormente para la producción recombinante del anticuerpo o la modificación para formar un análogo deseado.

La combinación de la tecnología de expresión de fago con el Xenomouse® ofrece una ventaja significativa respecto a aplicaciones anteriores de la expresión de fago. Típicamente para generar un anticuerpo altamente humano por la expresión de fagos, se prepara una genoteca de anticuerpo combinatoria de la médula ósea humana o de linfocitos de sangre periférica como se describe en Burton, D.R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) **88**:10134-10137. Usando este enfoque, ha sido posible aislar anticuerpos de alta afinidad frente a patógenos humanos a partir de individuos infectados, es decir, a partir de individuos que han sido "inmunizados" como se describe en Burton, D.R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) **88**:10134-10137, Zebedee, S.L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) **89**:3175-3179, y Barbas III, C.F., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) **89**:10164-20168. Sin embargo, para generar anticuerpos reactivos con antígenos humanos, ha sido necesario generar genotecas sintéticas (Barbas III C.F., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) **89**:4457-4461, Cramer, A., *et al.*, *BioTechniques* (1995) **88**: 194-196) o preparar genotecas de unos u otros pacientes autoinmunes (Rapoport, B., *et al.*, *Immunol. Today* (1995) **16**:43-49, Portolano, S., *et al.*, *J. Immunol.* (1993) **151**:2839-2851, y Vogel, M., *et al.*, *Eur J. Immunol.* (1994) **24**:1200-1207) como de individuos normales, es decir genotecas nuevas (Griffiths, A.D., *et al.*, *EMBO J.* (1994) **13**:3245-3260, Griffiths, A.D., *et al.*, *EMBO J.* (1993) **12**:725-734, Persson, M. A. A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) **88**:2432-2436, Griffiths, A.D., *Curr. Opin. Immunol.* (1993) **5**:263-267, Hoogenboom, H. R., *et al.*, *J. Mol. Biol.* (1992) **227**:381-388, Lerner, R. A., *et al.*, *Science* (1992) **258**:1313-1314, y Nissim A., *et al.*, *EMBO J.* (1994) **13**:692-698. Típicamente los anticuerpos de alta afinidad frente a proteínas humana se ha probado que son muy difíciles de aislar por este modo. Como es conocido, la maduración de la afinidad requiere una mutación somática y la mutación somática, a su vez, es conducida por el antígeno. En el Xenomouse, la inmunización repetida con proteínas humanas conducirá a la mutación somática y, por consiguiente, a anticuerpos de alta afinidad. Los genes que codifican estos anticuerpos pueden ser fácilmente amplificados por PCR como se describe en Marks, J. D., *et al.*, *J. Mol. Biol.* (1991) 581-596 y los anticuerpos inmunoespecíficos pueden ser aislados con panning técnicas de cribado estándar, Winter, G., *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* (1994) **12**:433-55 y Barbas III, C.F., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) **88**:7978-7982.

Como anteriormente, los *loci* modificados o no modificados reorganizados son manipulados usando técnicas recombinantes estándar construyendo sistemas de expresión operables en una célula huésped deseada, tales como, típicamente, una célula de ovario de hámster chino, y la inmunoglobulina deseada o el análogo es producido usando técnicas de expresión recombinante estándar, y es recuperado y purificado usando métodos convencionales.

La aplicación de los procedimientos precedentes para la producción de anticuerpos ha permitido la preparación de reactivos inmunoespecíficos humanos frente a antígenos para los cuales no han estado disponibles anticuerpos humanos anteriormente. Las inmunoglobulinas que resultan de los métodos anteriormente descritos y los análogos hechos posible así, proporcionan nuevas composiciones para uso en análisis, diagnóstico, investigación y terapia. El uso particular, por supuesto, dependerá de la inmunoglobulina o del análogo preparado. En general, las composiciones de la invención tendrán utilidades similares a las atribuibles a anticuerpos no humanos dirigidos contra el mismo antígeno. Tales utilidades incluyen, por ejemplo, el uso como ligandos de afinidad para la purificación, como reactivo en inmunoensayos, como componentes de inmunoconjugados, y como agentes terapéuticos para indicaciones apropiadas.

Particularmente, en el caso de agentes terapéuticos o agentes diagnósticos para uso *in vivo*, es altamente ventajoso emplear anticuerpos o sus análogos con características totalmente humanas. Estos reactivos evitan respuestas inmunes indeseadas engendradas por los anticuerpos o análogos que tienen características que los marcan como originantes de especies no humanas. Otras tentativas para "humanizar" anticuerpos no causan reactivos con características totalmente humanas. Por ejemplo, se preparan fácilmente anticuerpos quiméricos con regiones variables murinas y regiones constantes humanas, pero, por supuesto, conservan características murinas en las regiones variables. Incluso el procedimiento más difícil para "humanizar" las regiones variables manipulando los genes que codifican las secuencias de aminoácidos que forman las regiones marco no proporciona el resultado deseado porque las CDR, típicamente de origen no humano, no pueden ser manipuladas sin destruir la inmunoespecificidad.

Pueden ser usados anticuerpos humanos contra IL-8 para el tratamiento o la prevención de una patología o condición asociada a IL-8.

Moore *et al.*, *Nature*, vol. **365**, (14.10.1993) describen anticuerpos anti-IL-8 no humanos que previenen del daño por reperusión pulmonar.

## ES 2 304 786 T3

El documento WO 92/04372 describe anticuerpos de ratón contra péptidos IL-8. Se mostraron anticuerpos policlonales que inhibían la activación de neutrófilos.

Tales condiciones incluyen, pero no están limitadas a, metástasis tumoral, daño por reperfusión, edema pulmonar, asma, enfermedad isquémica tal como infarto de miocardio, enfermedad inflamatoria del intestino (tal como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa), encefalitis, uveítis, enfermedades autoinmunes (tales como la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren, vasculitis), osteoartritis, artritis gotosa, nefritis, insuficiencia renal, condiciones dermatológicas tales como la dermatitis inflamatoria, psoriasis, urticaria vasculítica y angitis alérgica, uveítis retinal, conjuntivitis, trastornos neurológicos tales como apoplejía, esclerosis múltiple y meningitis, daño agudo pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria de adulto (ARDS), choque séptico, pulmonía bacteriana, enfermedades que implican la diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, insuficiencia múltiple de órganos, hepatitis alcohólica, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, inflamación pulmonar (tales como pleuresía, aveolitis, vasculitis, pulmonía, bronquitis crónica, bronquiectasias, fibrosis cística), enfermedad de Behcet, granulomatosis de Wegener y síndrome vasculítico.

Las enfermedades autoinmunes típicas que pueden ser tratadas usando los anticuerpos anteriormente mencionados y análogos incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, psoriasis, esclerodermia de Sjögren, enfermedad mixta de tejido conectivo, dermatomiositis, polimiositis, síndrome de Reiter, enfermedad de Behcet, diabetes Tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple, miastenia gravis y pénfigo.

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos pueden ser administrados en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Pueden ser administrados por cualquier medio que permita al agente activo alcanzar el sitio de acción deseado, por ejemplo, intravenosamente mediante bolo o mediante infusión continua por un período de tiempo, por rutas intramusculares, subcutáneas, intraarticulares, intrasnoviales, intratecales, orales, tópicas o por inhalación. Los anticuerpos pueden ser administrados como una dosis individual o una serie de tratamientos.

Para la administración parenteral, los anticuerpos pueden ser formulados como una solución, suspensión, emulsión o pueden ser liofilizados en un polvo en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Si el anticuerpo es adecuado para la administración oral, la formulación puede contener aditivos adecuados tales como, por ejemplo, almidón, celulosa, sílice, varios azúcares, carbonato de magnesio o fosfato de calcio. Los vehículos adecuados son los descritos en la edición más reciente del Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia estándar en este campo.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo dependerá de factores conocidos tales como las características farmacodinámicas del anticuerpo particular, su modo y ruta de administración, edad, peso y la salud del receptor, el tipo de condición que se trate y la severidad y el curso de la condición, la frecuencia del tratamiento, el tratamiento simultáneo y el efecto fisiológico deseado. Los ejemplos de más abajo son requeridos para ilustrar, pero no limitar la invención.

En estos ejemplos, son usados ratones, denominados Xenomouse<sup>®</sup>, para las inmunizaciones iniciales. Una descripción detallada de tal Xenomouse<sup>®</sup> es encontrada en la solicitud PCT WO 94/02602 anteriormente mencionada. Los protocolos de inmunización apropiados para cada antígeno son descritos en los ejemplos específicos más abajo. Los sueros de Xenomouse<sup>®</sup> inmunizados (o los sobrenadantes de células B inmortalizadas) fueron titulados respecto a los anticuerpos humanos específicos de antígeno en cada caso usando un formato ELISA estándar. En este formato, el antígeno usado para la inmunización fue inmovilizado en los pocillos de placas de microtítulo. Las placas fueron lavadas y bloqueadas y fueron añadidos los sueros (o sobrenadantes) como diluciones sucesivas durante 1-2 horas de incubación. Después del lavado, el anticuerpo unido que tiene características humanas fue detectado añadiendo el anticuerpo de cadena  $\kappa$ ,  $\mu$ ,  $\gamma$  antihumano conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) durante una hora. Después de lavar de nuevo, el sustrato reactivo cromogénico o -fenilendiamina (OPD) y el peróxido de hidrógeno fueron añadidos y las placas fueron leídas 30 minutos más tarde a 492 nm usando un lector de microplaca.

A no ser que se especifique de otra manera, el antígeno fue revestido usando tampón de revestimiento de placa (tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6); el tampón de bloqueo de ensayo usado fue 0,5% de BSA, 0,1% de Tween 20 y 0,01% de timerosal en PBS; el tampón de sustrato usado en el desarrollo del color era ácido cítrico 7,14 g/l; fosfato de sodio dibásico 17,96 g/l; la solución de desarrollo (hecha inmediatamente antes del uso) fue 10 ml de tampón de sustrato, 10 mg de OPD, más 5 ml de peróxido de hidrógeno; la solución de parada (usada para parar el desarrollo del color) fue ácido sulfúrico 2 M. La solución de lavado fue 0,05% de Tween 20 en PBS.

### Ejemplo 1

#### *Anticuerpos humanos contra IL-6 humano*

De tres a cinco Xenomouse<sup>®</sup> de 8-20 semanas fueron cruzados por edad y fueron inmunizados intraperitonealmente con 50  $\mu$ g de IL-6 humano emulsionado en adyuvante de Freund incompleto para la inmunización primaria y en adyuvante de Freund completo para las inyecciones subsiguientes. Los ratones recibieron 6 inyecciones 2-3 semanas después. Los títulos de suero fueron determinados después de la segunda dosis y después de cada dosis a partir de entonces. Fueron realizados sangrados 6-7 días después de las inyecciones del plexo retrobulbar. Se permitió a la sangre

## ES 2 304 786 T3

coagularse a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas y luego fue incubada a 4°C durante al menos 2 horas antes de la separación y la recuperación de los sueros.

5 Fueron llevados a cabo ELISA como se describe anteriormente aplicando 100  $\mu$ l por pocillo de IL-6 recombinante humano a 2  $\mu$ g/ml en tampón de revestimiento. Las placas entonces fueron incubadas a 4°C de la noche a la mañana o a 37°C durante 2 horas y luego fueron lavadas tres veces en tampón de lavado. La adición de 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de bloqueo fue seguida de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas y 3 lavados adicionales.

10 Entonces, fueron añadidos a las placas 50  $\mu$ l/pocillo de muestras de suero diluidas (y controles positivos y negativos). Las placas entonces fueron incubadas a temperatura ambiente durante 2 horas y fueron de nuevo lavadas 3 veces.

15 Después del lavado, fueron añadidos 100  $\mu$ l por pocillo de anticuerpo de cadena  $\mu$  antihumano de ratón conjugado a HRP a 1/2.000 o anticuerpo de cadena  $\kappa$  antihumano de ratón conjugado a HRP a 1/2.000, diluido en el tampón de bloqueo. Después de una incubación de una 1 hora a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas 3 veces y fueron desarrolladas con sustrato OPD durante 10-25 minutos. Entonces fueron añadidos 50  $\mu$ l/pocillo de solución de parada y los resultados fueron leídos en un lector de placas ELISA a 492 nm. Se muestran las curvas de dilución que son el resultado de la titulación de suero a partir de Xenomouse® después de 6 inyecciones en la figura 3. Los datos en la figura 3 muestran la producción de anti-IL-6 inmuno-reactivo con  $\kappa$  antihumano y  $\mu$  antihumano detectable en las diluciones de suero anteriores 1:1.000.

### Ejemplo 2

#### 25 *Anticuerpos humanos contra TNF- $\alpha$ humano*

La inmunización y la preparación de suero fueron llevadas a cabo como se describe en el Ejemplo 1 pero el TNF- $\alpha$  recombinante humano (a 5  $\mu$ g por inyección) fue sustituido con IL-6 humano. Los ELISA fueron llevados a cabo como se describe en el Ejemplo 1 pero el revestimiento inicial de la placa ELISA empleó 100  $\mu$ l/pocillo de TNF- $\alpha$  recombinante humano a 1  $\mu$ g/ml en tampón de revestimiento.

Se muestran las curvas de dilución para el suero del Xenomouse® después de 6 inyecciones obtenidas en la figura 4. Se mostraron los títulos significativos de nuevo de la unión de anti-TNF- $\alpha$  humano.

35 Se muestran los títulos en suero para  $h\gamma$ ,  $h\mu$  y  $h\kappa$  después de una y dos inmunizaciones del Xenomouse® en la Tabla 1. Cuando se expone a TNF- $\alpha$ , el Xenomouse® cambia los isotipos desde una respuesta de IgM predominante en la primera inmunización a una respuesta inmune con un gran componente de IgG en la segunda inmunización.

(Tabla pasa a página siguiente)



# ES 2 304 786 T3

TABLA 2

*Respuestas del título en suero de anti-TNF- $\alpha$  del Xenomouse-2*

XM2		Sangrado 1: después de 2 inmunizaciones Sangrado 2: después de 3 inmunizaciones		
		Títulos de ELISA en suero específicos para TNF- $\alpha$		
		título (vía hy)	título (vía h $\mu$ )	título (vía hc)
1	sangrado 1	500	3.000	1.500
	sangrado 2	10.000	8.000	15.000
2	sangrado 1	200	3.000	500
	sangrado 2	2.700	5.000	1.000
3	sangrado 1	<500	2.000	1.500
	sangrado 2	15.000	24.000	25.000
4	sangrado 1	500	2.500	1.500
	sangrado 2	70.000	4.000	72.000
5	sangrado 1	<500	2.500	1.500
	sangrado 2	1.000	10.000	7.000
6	sangrado 1	1.000	13.000	4.500
	sangrado 2	10.000	24.000	25.000
7	sangrado 1	<500	2.500	1.500
	sangrado 2	5.000	4.000	9.000
8	sangrado 1	<500	1.000	500
	sangrado 2	2.700	5.000	9.000
9	sangrado 1	200	6.000	4.000
	sangrado 2	40.000	80.000	80.000
10	sangrado 1	200	2.000	500
	sangrado 2	15.000	8.000	60.000
11	sangrado 1	1.500	1.000	1.500
	sangrado 2	24.000	2.700	72.000
12	sangrado 1	200	2.000	1.000
	sangrado 2	10.000	4.000	25.000
13	sangrado 1	500	30.000	500
	sangrado 2	2.000	4.000	12.000

### Ejemplo 3

#### *Anticuerpos humanos contra CD4 humano*

El antígeno humano CD4 fue preparado como una proteína de superficie usando CD4 $\zeta$  humano en células recombinantes transfectadas como sigue. CD4 $\zeta$  humano consiste en el dominio extracelular de CD4, el dominio transmembrana de CD4, y el dominio citoplásmico correspondiente a los restos 31-142, de la cadena  $\zeta$  madura del complejo CD3. El CD4 $\zeta$  humano (F15 LTR) como se describe en Roberts, *et al.*, *Blood* (1994) **84**:2878 fue introducido en la línea celular leucémica de basófilos de rata RBL-2H3, descrita por Callan, M., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) **90**:10454 usando el sistema de transducción de alta eficacia de Kat descrito por Finer, *et al.*, *Blood* (1994) **83**:43. Brevemente, fueron cultivadas células RBL-2H3 a  $10^6$  células por pocillo en 750 ml. DMEM<sup>100</sup> + 20% FBS (Gibco) y 16  $\mu$ g/ml de polibreno con un volumen igual de sobrenadante proviral durante 2 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Un ml de medio fue retirado y 750  $\mu$ l de medio de infección y sobrenadante retroviral fueron añadidos a cada pocillo y los cultivos fueron incubados de la noche a la mañana. Las células fueron lavadas y expandidas en DMEM<sup>100</sup> + 10% FBS hasta que células suficientes estuvieran disponibles para la clasificación. Las células RBL-2H3 CD4 $\zeta$  transducidas fueron clasificadas usando el FACSTAR plus (Becton Dickinson). Las células fueron teñidas para CD4 humano con un anticuerpo de CD4-PE antihumano de ratón y fueron seleccionadas más del 2-3% de células que expresaban.

Las inmunizaciones fueron llevadas a cabo como se describe en el Ejemplo 1 usando  $10 \times 10^6$  células por ratón excepto que la inyección primaria fue subcutánea en la base del cuello. Los ratones recibieron 6 inyecciones 2-3 semanas después. El suero fue preparado y analizado por ELISA como se describe en el Ejemplo 1 excepto que el revestimiento inicial de la placa ELISA se utilizaron 100  $\mu$ l por pocillo de CD4 soluble recombinante en 2  $\mu$ g/ml de tampón de revestimiento. Se muestra la curva de titulación para el suero de XenoMouse<sup>®</sup> después de 6 inyecciones en la figura 4. Se muestran los títulos de reactividad de anti-CD4 humano a concentraciones que representan mayores que las de dilución 1:1.000.

## ES 2 304 786 T3

### Ejemplo 4

#### *Anticuerpos humanos contra L-selectina humana*

5 El antígeno fue preparado como una proteína expresada en superficie en células C51, un clon de alta expresión derivado transfectando la célula pre-B de ratón 300.19 con cADN de LAM-1 (LAM-1 es el gen que codifica a la L-selectina) (Tedder, *et al.*, *J Immunol* (1990) **144**:532) o con células CHO transfectadas de modo similar. Las células transfectadas fueron clasificadas usando la clasificación de células activadas fluorescentes usando el anticuerpo anti-Leu-8 como marcador.

10 Las células C51 y CHO transfectadas fueron cultivadas en DME 4,5 g/l glucosa con 10% FCS y 1 mg/ml G418 en placas de 100 mm. Las células control negativas, 3T3-P317 (transfectedas con genes gag/pol/env de virus Moloney) fueron cultivadas en el mismo medio sin G418.

15 La inmunización primaria fue por inyección subcutánea en la base del cuello; las inyecciones subsecuentes fueron intraperitoneales. 70-100 millones de células C51 o CHO transfectadas fueron usadas por inyección para un total de cinco inyecciones 2-3 semanas después.

20 Los sueros fueron recogidos como se describe en el Ejemplo 1 y fueron analizados por ELISA en un protocolo similar al expuesto en el Ejemplo 1.

25 Para el ELISA, las células transfectadas fueron colocadas en placas de 96 pocillos y fueron cultivadas monocapas de células durante 1-2 días dependiendo del número de células y fueron usadas para el ELISA cuando se realizó la confluencia. Las células fueron fijadas por el primer lavado con 1 x PBS frío y luego fue añadida la solución de fijado (ácido acético glacial del 5%, etanol del 95%). Las placas fueron incubadas a -25°C durante 5 minutos y pueden ser almacenadas a esta temperatura si se sella con selladores de placa.

30 El ELISA es comenzado llevando las placas a temperatura ambiente, golpeando para eliminar la solución de fijado y lavando 5 veces con medio DMEM que contiene 10% FCS a 200  $\mu$ l por pocillo.

Los pocillos fueron tratados con varias diluciones de suero o con controles positivos o negativos. Los pocillos control positivos contenían anticuepo monoclonal IgG1 murino frente a L-selectina humana.

35 Los pocillos fueron incubados durante 45 minutos y la integridad de la monocapa fue comprobada con un microscopio. Los pocillos entonces fueron incubados con anticuerpo de cadena  $\kappa$  antihumano o anticuerpo de cadena  $\mu$  antihumano conjugado con HRP descrito en el Ejemplo 1. Las placas entonces fueron lavadas con 1% BSA/PBS y de nuevo con PBS y la integridad de la monocapa fue comprobada. Las placas fueron desarrolladas, paradas y leídas como se describe anteriormente. Se muestran los resultados para el suero de Xenomouse® en las figuras 6 y 7; fueron obtenidos anticuerpos humanos tanto frente a L-selectina como a células 3T3 control. Sin embargo, los títulos en suero son más altos para las células que expresan L-selectina que con células 3T3 parentales. Estos resultados muestran que el Xenomouse® produce anticuerpos específicos para L-selectina con regiones de cadena pesada  $\mu$  humana y/o cadenas ligeras  $\kappa$  humanas.

45 El antisuero obtenido del Xenomouse® inmunizado también fue analizado por tinción de neutrófilos humanos que expresan L-selectina. Los neutrófilos humanos fueron preparados como sigue:

50 fue recogida sangre periférica a partir de voluntarios normales con 100 unidades/ml de heparina. Aproximadamente 3,5 ml de sangre fue estratificada en un volumen igual de One-step Polymorph Gradient (Accurate Chemical, Westbury, Nueva York) y se centrifugaron durante 30 minutos a 450 x g a 20°C. La fracción de neutrófilos fue eliminada y lavada dos veces en DPBS/2% FBS.

Los neutrófilos entonces fueron teñidos con:

- 55
- (1) tanto antisuero de Xenomouse® inmunizado con células C51 (que expresan L-selectina);
  - (2) como un antisuero control negativo a partir de un Xenomouse® inmunizado con células que expresan gp39 humano.

60 Los neutrófilos teñidos y lavados fueron analizados con FACS. Se muestran los resultados para el antisuero de Xenomouse® en la figura 8.

65 Estos resultados muestran la presencia de anticuerpos en el suero inmunizado de Xenomouse® que contienen cadenas ligeras totalmente humanas inmuno-reactivas con L-selectina. El antisuero control negativo de ratones inmunizados con gp39 no contiene anticuerpos reactivos contra neutrófilos humanos.

## ES 2 304 786 T3

### Ejemplo 5

#### *Anticuerpos humanos contra gp39 humano*

5 Gp39 (el ligando para CD40) es expresado en células CD4 T activadas humanas. Los sueros de XenoMouse® inmunizados con gp39 recombinante de acuerdo con este ejemplo contenían anticuerpos totalmente humanos innoespecíficos para gp39.

10 El antígeno consistió en transfectantes estables de células 300.19 o de células CHO que expresaban cADN de gp39 clonado en el vector de expresión de mamíferos P1K1.HUgp39/IRES NEO como se muestra en la figura 9. Las células CHO fueron excindidas 1:10 antes de la transfección en DMEM glucosa 4,5 g/l, 10% FBS, glutamina 2 mM, MEM, NEAA suplementado con glicina adicional, hipoxantina y timidina. Las células fueron cotransfectadas con el vector gp39 en una placa a 9 µg/10 cm (6 x 10<sup>5</sup> células) y el vector que expresa DHFR pSV2DHFRs (Subranani *et al.*, *Mol Cell Biol* (1981) 9:854) en una placa a 1 µg/10 cm usando la transfección con fosfato de calcio. 24 horas más tarde las  
15 células fueron excindidas 1:10 en el medio original que contenía G418 a 0,6 mg/ml. Las células que producen gp39 fueron clasificadas por FACS usando un anticuerpo anti-gp39.

Los ratones agrupados como se describe en el Ejemplo 1 fueron inmunizados con células 300.19 que expresaban gp39 usando una inmunización primaria subcutáneamente en la base del cuello y con inyecciones secundarias intraperitoneales cada 2-3 semanas. Los sueros fueron recolectados como se describe en el Ejemplo 1 para el ensayo ELISA. El procedimiento ELISA fue llevado a cabo sustancialmente como se expone en el Ejemplo 1; las placas de microtítulo fueron revestidas de células CHOD que expresan gp39 cultivadas en una placa de 100 mm en DMEM, 4,5 g/l de glucosa, 10% FCS, glutamina 4 mM y solución de aminoácido no esencial (NEAA) para MEM (100 x). Durante el día que precedió al ensayo ELISA, las células fueron tripsinizadas y puestas en placas de filtración a 10<sup>5</sup> células/200 µl pocillo y fueron incubadas a 37°C de la noche a la mañana. Los controles positivos fueron gp39 antihumano de ratón; los controles negativos eran antisero de ratones inmunizados con un antígeno diferente al gp39. 50 µl de muestra fueron usados para cada ensayo. El resto del ensayo es como se describe en el Ejemplo 1.

Se muestran las curvas de dilución para los sueros obtenidos después de 4 inyecciones de ratones inmunizados con gp39 expresado en células CHO en la figura 10. Como se muestra, los sueros contenían gp39 antihumano innoespecífico que es detectable con anticuerpos de cadena κ antihumana y µ antihumana acoplados a HRP.

### Ejemplo 6

#### *Preparación de anticuerpos monoclonales humanos contra la toxina del tétano*

Los anticuerpos preparados en este ejemplo fueron secretados por hibridomas obtenidos inmortalizando células B del xenomice inmunizado con la toxina del tétano. El protocolo de inmunización era similar al expuesto en el Ejemplo 1 usando 50 µg de toxina del tétano emulsionada en adyuvante de Freund completo para la inmunización intraperitoneal primaria seguido de las inyecciones subsecuentes intraperitoneales con el antígeno incorporado en el adyuvante de Freund incompleto. Los ratones recibieron un total de 4 inyecciones 2-3 semanas después.

Después de que fueran obtenidos los títulos en suero aceptables de la toxina C antitétano (anti-TTC), fue proporcionada una dosis de inmunización final del antígeno en PBS 4 días antes de que los animales fueran sacrificados y los bazo recolectados para la fusión.

Las células de bazo fueron fusionadas con células de mieloma P3X63-Ag8.653 como se describe por Galfre, G. y Milstein, C. *Methods in Enzymology* (1981) 73:3-46.

Después de la fusión, las células fueron resuspendidas en DMEM, 15% de FCS, conteniendo HAT suplementado con glutamina, pen/strep para el cultivo a 37°C y 10% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron colocadas en placas de microtítulo y mantenidas en medio suplementado con HAT durante dos semanas antes de la transferencia al medio suplementado con HAT. Los sobrenadantes de los pocillos que contenían hibridomas fueron recogidos para una selección primaria usando un ELISA.

El ELISA fue llevado a cabo como se describe en el Ejemplo 1 en el que el revestimiento de antígeno consistió en 100 µl/pocillo de la proteína toxina C del tétano (TTC) a 2 mg/ml en tampón de revestimiento, seguido de la incubación a 4°C de la noche a la mañana o a 37°C durante dos horas. En el ELISA primario, fue usada IgM antihumano de ratón conjugado con HRP como se describe en el Ejemplo 1. Dos hibridomas que secretaban anti-TTC de acuerdo con el ensayo ELISA, clon D5.1 y clon K4.1, fueron usados para posteriores análisis.

Como se muestra en la figura 11, el clon D5.1 secreta anti-TTC totalmente humano que es detectable usando el anticuerpo de cadena µ conjugado con HRP antihumano y el anticuerpo de cadena κ conjugado con HRP antihumano. Se confirma esto en la Figura 11.

El anticuerpo secretado por D5.1 no era inno-reactivo en los ELISA que usan TNF-α, IL-6 o IL-8 como antígeno inmovilizado en condiciones donde los controles positivos (sueros de xenomice inmunizado con TNF-α, IL-6 e IL-8 respectivamente) mostraron resultados de ELISA positivos.

## ES 2 304 786 T3

La secuencia de nucleótidos completa de los cADN que codifican las cadenas pesada y ligera del monoclonal fue determinada como se muestra en las Figuras 12 y 13. El mRNA polyA fue aislado a partir de aproximadamente  $10^6$  células de hibridoma y fue usado para generar cADN usando hexámeros aleatorios como cebadores. Las partes del producto fueron amplificadas por PCR usando los cebadores apropiados.

Se sabía que la línea celular proporcionaba cadenas ligeras  $\kappa$  humanas; para la amplificación por PCR del cADN que codifica la cadena ligera, los cebadores usados fueron HKPI (5'-CTCTGTGACTCTCCTGGGAGTT-3') para cebar desde el extremo de la región constante y dos oligos, usados en cantidades iguales para cebar a partir de los segmentos variables; B3 (5'-GAAACGACTCACGCAGTCTC-CAGC-3').

Para la amplificación de la cadena pesada del anticuerpo derivado a partir de D5.1 (que contiene la región humana  $\mu$  constante), fue usado MG-24VI para cebar a partir de la variable y  $\mu$ P1 (5'-TTTTCTTTGTTGCCGTTGGGGTGC-3') fue usado para cebar desde el extremo de la región constante.

Con referencia a la Figura 12 que representa la secuencia para la cadena pesada del anticuerpo secretado por el clon D5.1, ésta muestra que la cadena pesada está comprendida del fragmento variable humano VH6, la región de diversidad humana DN1 y el segmento de unión humano JH4 unido a la región constante  $\mu$  humana. Había dos mutaciones de pares de bases de la secuencia de la línea germinal en la región variable, ambas en las CDR. Dos mutaciones adicionales estaban en el segmento D y seis adiciones de nucleótidos de la línea no germinal estaban presentes en la unión D<sub>b</sub>-J<sub>b</sub>.

Finalmente, con referencia a la Figura 13 que presenta la cadena ligera del anticuerpo secretado por D5.1, se muestra la región variable de  $\kappa$  humana B3 y la región de unión  $\kappa$  humana JK3. Hay nueve diferencias de pares de bases a partir de las secuencias de la línea germinal, tres en CDR1.

### Ejemplo 7

#### *Anticuerpos humanos contra PTHrp*

Grupos de Xenomouse<sup>®</sup>-2 fueron inmunizados intraperitonealmente con PTHrp (1-34) conjugado con BTG, como se describe en Ratcliffe *et al.*, *J. Immunol. Methods* **127**:109 (1990), o con PTHrp (1-34) sintetizado como un MAP 4 ramificado (sistema de péptido antigénico múltiple). Los antígenos fueron emulsionados en CFA (adyuvante de Freund completo) y fueron inyectados i.p. en una dosis de 25  $\mu$ g por animal en intervalos de 2 semanas, y fue realizado el sangrado después de dos inyecciones. Los sueros obtenidos a partir de este sangrado fueron analizados por ELISA como se describe *supra*.

Se muestran los títulos en suero para  $h\gamma$ ,  $h\mu$  y  $h\kappa$  después de una inmunización del Xenomouse<sup>®</sup> en la Tabla 2. Cuando se inmuniza con PTHrp, el Xenomouse<sup>®</sup> muestra títulos en suero bajos en 5 de 7 ratones en el primer sangrado, pero cuando se usa PTHrp-MAP, 7 de 7 ratones muestran altos títulos en suero en el primer sangrado.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 304 786 T3

TABLA 1

*Respuestas de título en suero de antiPTHrp de Xenomouse-2*

5

10

15

20

25

30

35

40

Primer sangrado después de 2 inmunizaciones con cada conjugado de PTHrp-BTG			
<u>Conjugado XM2 PTHrp-BTG</u>	<u>Respuestas en humanos</u>		
	título (vía hγ)	título (vía hμ)	título (vía hκ)
1	<30	850	100
2	<30	3.000	50
3	<30	7.000	1.000
4	<30	800	200
5	<30	400	90
6	<30	500	50
7	<30	300	50
<u>XM2 PTHrp-MAP</u>	título (vía hγ)	título (vía hμ)	título (vía hκ)
1	<30	1.000	50
2	<30	2.500	300
3	<30	1.200	150
4	150	1.000	270
5	100	2.500	300
6	<30	1.000	150
7	<30	4.000	800

Ejemplo 8

45

*Anticuerpos humanos contra IL-8 humano*

La inmunización y la preparación de suero fueron como las descritas en el Ejemplo 1 pero IL-8 humano recombinante fue usado como inmunógeno.

50

Fueron realizados ensayos ELISA con respecto al suero recuperado, también exactamente como se describe en el Ejemplo 1, pero las placas de ELISA fueron cubiertas al principio usando 100 μl/pocillo de IL-8 recombinante humano a 0,5 mg/ml en el tampón de revestimiento. Se muestran los resultados obtenidos para varias diluciones de suero de Xenomouse® después de 6 inyecciones en la Figura 14. De nuevo se mostró la unión de anti-IL-8 humano en diluciones de suero que tenían concentraciones más altas que las representadas por una dilución 1:1.000.

55

Ejemplo 9

*Preparación de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad contra IL-8 humano*

60

Grupos de 4 a 6 Xenomouse® de entre 8 a 10 semanas fueron usados para la inmunización y para la generación del hibridoma. Los Xenomouse® fueron inmunizados intraperitonealmente con 25 μg de IL-8 recombinante humano (Biosource International, CA, USA) emulsionado en adyuvante de Freund completo (CFA, Sigma) para la inmunización primaria. Todas las inyecciones subsecuentes fueron hechas con el antígeno incorporado en el adyuvante de Freund incompleto (IFA, Sigma). Para los animales usados como donantes de bazo para la generación del hibridoma se les administró una dosis final de antígeno en una solución salina de tampón fosfato (PBS) 4 días antes de la fusión. Los títulos en suero del Xenomouse® inmunizado primero fueron analizados después de una dosis secundaria de antígenos, y a partir de esto, después de cada dosis de antígeno. Fueron realizados análisis de sangre de 6 a 7

65

días después de las inyecciones, por sangrado del plexo retrobulbar. Se permitió a la sangre coagularse a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas y luego se incubó a 4°C durante al menos 2 horas antes de la separación y la recuperación de los sueros.

#### 5 Generación de hibridomas

Las células de bazo obtenidas a partir del Xenomouse® antes inmunizado con el antígeno, fueron fusionadas con células de mieloma NSO no secretoras transfectadas con *bcl-2* (NSO-bc12) como se describe en Galfre G. *et al.*, *Methods in Enzymology* **73**, 3-46, (1981). Brevemente, la fusión fue realizada mezclando células de bazo lavadas y células de mieloma en una relación de 5:1 y formando peletes con cuidado por centrifugación a 800 x g. Después de la eliminación completa del sobrenadante, las células fueron tratadas con 1 ml de 50% PEG/DMSO (polietilenglicol PM 1500, 10% DMSO, Sigma) que fue añadido en un 1 minuto, la mezcla además fue incubada durante un minuto, y fue gradualmente diluida con 2 ml de DMEM en 2 minutos y fue diluida además con 8 ml de DMEM en 3 minutos. El procedimiento fue realizado a 37°C con agitación suave continuada. Después de la fusión, las células fueron resuspendidas en DMEM, 15% FCS, conteniendo HAT, y fueron complementadas con L-glutamina, pen/strep, para un cultivo a 37°C y 10% CO<sub>2</sub> en aire. Las células fueron colocadas en placas en bandejas de microtítulo de 96 pocillos de fondo redondo. Los cultivos fueron mantenidos en medio HAT suplementado durante 2 semanas antes de la transferencia al medio HAT suplementado. Los cultivos fueron examinados con regularidad por el crecimiento de células híbridas, y los sobrenadantes de aquellos pocillos que contenían los hibridomas fueron recogidos para su análisis de selección primario para detectar la presencia de cadenas  $\mu$  humana,  $\gamma$  2 humana y  $\kappa$  humana en un ELISA específico de antígeno como se describe anteriormente. Los cultivos positivos fueron transferidos a placas de 48 pocillos y cuando alcanzaron la confluencia fueron transferidos a placas de 24 pocillos. Los sobrenadantes fueron analizados en un ELISA específico de antígeno para detectar la presencia de cadenas  $\mu$  humana,  $\gamma$  2 humana y  $\kappa$  humana.

Como se muestra en la Tabla 3, varios hibridomas que secretaban anticuerpos monoclonales totalmente humanos con especificidad para IL-8 humano han sido generados a partir de fusiones representativas. En todos estos anticuerpos monoclonales humanos la cadena pesada  $\gamma$  2 humana está asociada a la cadena ligera  $\kappa$  humana.

TABLA 3

*Determinación de ELISA de la composición de la cadena pesada y ligera de anticuerpos monoclonales anti-IL-8 humano generados en Xenomouse®*

Muestra ID	Clase Ig	Reactividad frente a hIL8				hIgG total (ng/ml)
		títulos	H $\kappa$ OD (1:1)	m $\lambda$ OD (1:1)	h $\gamma$ OD (1:1)	
Bkgd			0,08	0,04	0,12	
I8D1.1	hIgG2	500	4,12	0,04	4,09	1,159
I8K2.1	hIgG2	200	4,18	0,18	4,11	2,000
I8K2.2	hIgG2	1,000	4,00	0,04	4,00	4,583
I8K4.2	hIgG2	200	3,98	0,04	3,49	450
I8K4.3	hIgG2	200	3,80	0,05	4,09	1,715
I8K4.5	hIgG2	1,000	4,00	0,06	4,00	1,468

#### *Evaluación de constantes cinéticas de hibridomas de Xenomouse®*

Para determinar los parámetros cinéticos de estos anticuerpos, específicamente sus velocidades de unión y de disociación y sus constantes de disociación (KD), fueron analizadas en un instrumento BIAcore (Pharmacia). El instrumento BIAcore usa la resonancia de plasmón para medir la unión de un anticuerpo a un chip de oro revestido por un antígeno.

#### *Reactivos del BIAcore e instrumentación*

El instrumento BIAcore, chips sensores CM5, tensioactivo P20, y el kit de acoplamiento de amina que contiene N-hidroxisuccinimida (NHS), N-etil-N'-(3-dietilaminopropil)-carbodimida (EDC), y la etanolamina fueron comprados en Pharmacia Biosensor. La inmovilización de IL-8 humano recombinante en la superficie del sensor fue llevada a

## ES 2 304 786 T3

cabo a bajos niveles de densidad del antígeno inmovilizado sobre la superficie y fue realizada de acuerdo con los procedimientos generales descritos por los fabricantes. Brevemente, después del lavado y de equilibrar el instrumento con tampón HEPES (HBS; HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, tensioactivo del 0,05% P20, pH 7,4) la superficie fue activada y el IL-8 fue inmovilizado para la unión subsecuente y los estudios cinéticos. La superficie del sensor fue activada con 5  $\mu$ l de una mezcla de volúmenes iguales de NHS (0,1 M) y EDC (0,1 M) inyectado a 10  $\mu$ l/min a través de la superficie para la activación, entonces 5  $\mu$ l del ligando (IL-8 recombinante humano) en 12  $\mu$ g/ml en tampón maleato 5 mM, pH 6,0 fue inyectado a través de la superficie activada, y finalmente los sitios activos no conjugados fueron bloqueados con una inyección de 35  $\mu$ l de etanolamina 1 M. La superficie fue lavada para eliminar el ligando no covalentemente unido por la inyección de 5  $\mu$ l de HCl 0,1 M. Todo el procedimiento de inmovilización fue llevado a cabo con un flujo continuo de HBS de 10  $\mu$ l/min. Aproximadamente 100 unidades de resonancia (RU) de ligando (82 y 139 RU, en experimentos separados) fueron inmovilizadas sobre el chip sensor, (de acuerdo con los fabricantes 1.000 RU corresponden a aproximadamente 1 ng/mm<sup>2</sup> de proteína inmovilizada).

Estas superficies revestidas de ligando fueron usadas para analizar los sobrenadantes del hibridoma para detectar su unión específica al ligando y para los estudios cinéticos. La mejor condición para regenerar la disociación de analito del ligando en estos chips sensores era una inyección de 10  $\mu$ l de HCl 100 mM sin pérdidas significativas de unión observadas después de muchos ciclos de unión y regeneración.

Determinación de las velocidades de asociación y disociación y de las constantes de afinidad aparentes de anticuerpos monoclonales totalmente humanos específicos para IL-8.

La determinación de medidas cinéticas usando el BIACORE, en el cual los reactantes son inmovilizados sobre la superficie del sensor, fue hecha siguiendo los procedimientos sugeridos por los fabricantes y fue descrita en Karlsson *et al.* "Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interaction with a new biosensor based analytical system." *J. Immunol. Methods* (1991) 145, 229. Brevemente, la interacción del sitio individual entre dos moléculas A y B es descrita por la ecuación siguiente.

$$d[AB]/dt = k_a[A][B] - k_d[AB]$$

en la que, B es inmovilizado sobre la superficie y A es inyectado a una concentración constante C. La respuesta es una medida de la concentración del complejo [AB] y todos los términos de concentración pueden ser expresados como Unidades de Respuesta (RU) del BIACORE:

$$dR/dt = k_aC(R_{max} - R) - k_dR$$

donde  $dR/dt$  es la velocidad del cambio de la señal, C es la concentración del analito,  $R_{max}$  es la capacidad de unión máxima del analito en RU y R es la señal en RU en el tiempo t. En este análisis los valores de  $k_a$  y  $k_d$  son independientes de la concentración de ligando inmovilizado sobre la superficie del sensor. Las velocidades de disociación ( $k_d$ ) y las velocidades de asociación ( $k_a$ ) fueron determinadas usando el software proporcionado por los fabricantes, BIA evaluation 2.1. La constante de la velocidad de disociación fue medida durante la fase de disociación que se extendió durante 10 minutos a un caudal de tampón constante de 45  $\mu$ l/min, después de terminar la inyección de los sobrenadantes de hibridoma en la superficie que contiene a IL-8 inmovilizado. La fase de asociación se amplió en más de 1,25 minutos a un caudal de 45  $\mu$ l/min y los datos fueron introducidos en el modelo usando los valores de  $k_d$  antes determinados. Al menos dos superficies con niveles diferentes de ligando inmovilizado fueron usadas en las que las diferentes concentraciones de sobrenadantes de hibridoma de anti IL-8 fueron analizadas para determinar la unión y fueron analizados sus datos cinéticos. Las constantes cinéticas determinadas sobre estas dos superficies se presentan en la Tabla 4. Las afinidades fueron determinadas que estaban muy en los límites de  $7 \times 10^{-11}$  a  $2 \times 10^{-9}$  M. Esta comparación varía favorablemente con las afinidades de anticuerpos monoclonales murinos derivados de ratones normales.

# ES 2 304 786 T3

TABLA 4

Constantes cinéticas de anticuerpos monoclonales totalmente humanos (IgG2,  $\kappa$ ) derivados de Xenomouse®  
II-a con especificidad frente a IL-8 humano, determinado por BIAcore

Hibridoma	velocidad de asociación $k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	velocidad de disociación $k_d$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	Constante de disociación $KD$ (M) = $k_d/k_a$	h-IL-8 en la superficie del BIAcore [RU]
I8D1-1	$3,36 \times 10^5$	$2,58 \times 10^{-4}$	$7,70 \times 10^{-11}$	81
	$2,80 \times 10^5$	$1,73 \times 10^{-4}$	$6,20 \times 10^{-11}$	134
I8D1-1	$4,38 \times 10^5$	$6,73 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-9}$	81
	$3,83 \times 10^5$	$6,85 \times 10^{-4}$	$1,79 \times 10^{-9}$	134
I8K2-2	$5,24 \times 10^5$	$2,26 \times 10^{-4}$	$4,30 \times 10^{-10}$	81
	$4,35 \times 10^5$	$2,30 \times 10^{-4}$	$5,30 \times 10^{-10}$	134
I8K4-2	$5,76 \times 10^5$	$8,17 \times 10^{-4}$	$1,42 \times 10^{-10}$	81
	$1,95 \times 10^5$	$3,84 \times 10^{-4}$	$1,96 \times 10^{-10}$	134
I8K4-3	$2,66 \times 10^5$	$7,53 \times 10^{-4}$	$2,83 \times 10^{-10}$	81
	$1,46 \times 10^5$	$5,72 \times 10^{-4}$	$3,90 \times 10^{-10}$	134
I8K4-5	$4,00 \times 10^5$	$9,04 \times 10^{-4}$	$2,26 \times 10^{-9}$	81
	$1,70 \times 10^5$	$4,55 \times 10^{-4}$	$2,68 \times 10^{-9}$	134

## Métodos para el aislamiento de neutrófilos humanos y ensayos para la actividad del anticuerpo

La función primaria *in vivo* de IL-8 es atraer y activar los neutrófilos. Los neutrófilos expresan sobre su superficie dos receptores distintos para IL-8, denominados receptor A y receptor B. Para determinar si los anticuerpos totalmente humanos podrían neutralizar la actividad de IL-8, fueron realizados dos análisis *in vitro* diferentes con neutrófilos humanos. En un ensayo, fue analizada la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de IL-8 radiomarcado a receptores de IL-8 de neutrófilos. En un segundo ensayo, los anticuerpos fueron analizados respecto a su capacidad de bloquear una respuesta inducida por IL-8 en neutrófilos, a saber, la sobre-regulación de la integrina Mac-1 sobre la superficie del neutrófilo. El Mac-1 está compuesto de dos cadenas de polipéptidos, CD11b y CD18. Típicamente los anticuerpos anti-CD11b son usados para su detección.

## Aislamiento de neutrófilos

Neutrófilos humanos son aislados a partir de sangre recién extraída o de la capa leucocitaria. La sangre humana es recogida por punción venosa en tubos estériles que contienen EDTA. Las capas leucocitarias son obtenidas del banco de sangre de Stanford. Se preparan centrifugando la sangre anticoagulada (hasta 400 ml) en bolsas de plástico a 2600 x g durante 10 minutos a 20°C con el freno desconectado. El sobrenadante del plasma es aspirado de la bolsa y la capa leucocitaria, es decir, la capa de células superior (40-50 ml/bolsa) es recogida. Una unidad de capa leucocitaria (40-50 ml) es diluida a un volumen final de 120 ml con PBS libre de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . 30 mililitros de sangre o la capa leucocitaria diluida se transfiere en tubos de centrifugadora de 50 ml en la parte superior de una capa de 20 ml de Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech). Los tubos son centrifugados a 500 x g durante 20 minutos a 20°C con el freno desconectado. El sobrenadante, las células mononucleares en el interfaz, y la capa superior del pelete se retiran con cuidado. Para eliminar completamente las células mononucleares, el pelete que contiene neutrófilos y eritrocitos es resuspendido con 5 ml de PBS y transferido en tubos limpios de 50 ml. Las células son lavadas en PBS libre de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (300 x g durante 5 minutos a 4°C). Los eritrocitos entonces son lisados con cloruro de amonio. Las células son resuspendidas en 40 ml de una solución helada que contiene  $NH_4Cl$  155 mM y EDTA 10 mM, pH 7,2-7,4. Los tubos son mantenidos en hielo durante 10 minutos con mezcla ocasional y luego son centrifugados a 300 x g durante 5 minutos a 4°C. El pelete es resuspendido en PBS y lavado una vez (300 x g durante 5 minutos a 4°C). Si la lisis de eritrocitos parece incompleta, el tratamiento con cloruro de amonio es repetido. Los neutrófilos son lavados de nuevo y finalmente son suspendidos tanto en medio de ensayo (RPMI-1640 suplementado con suero de becerro fetal del 10%, L-glutamina 2 mM,  $5 \times 10^{-5}$  2-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales 1X, piruvato de sodio 1 mM y Hepes 10 mM) a una densidad de  $3 \times 10^7$  células/ml o en tampón de unión (PBS conteniendo albúmina de suero bovino del 0,1% y  $NaN_3$  0,02%), a una densidad de  $6 \times 10^6$  células/ml.

## Ensayo de unión del receptor de IL-8

Fueron pretratadas placas de filtro de multiselección (96 pocillos, Millipore, MADV N6550) con un tampón de unión de PBS conteniendo albúmina de suero bovino del 0,1% y  $NaN$  del 0,02%, a 25°C durante 2 horas. Un volumen final de 150  $\mu$ l, que contenía  $4 \times 10^5$  neutrófilos, [ $^{125}I$ ]-humano-IL-8 0,23 nM (Amersham, IM-249) y concentraciones variables de anticuerpos dispuestos en tampón de unión de PBS, fueron añadidas a cada pocillo, y las placas fueron incubadas durante 90 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas 5 veces con 200  $\mu$ l de PBS helado, que fue eliminado



## ES 2 304 786 T3

por aspiración. Los filtros fueron secados por aire, fueron añadidos 3,5 ml de fluido de centelleo (Beckman Ready Safe) y los filtros fueron contados en un contador Beckman LS6000IC. Los datos obtenidos son presentados como el % [<sup>125</sup>I]-IL-8 específico unido, que es calculado como el cpm en presencia del anticuerpo dividido por el cpm en presencia de tampón de unión de PBS sólo y multiplicado por 100 (Figura 15). Todos los seis monoclonales anti-IL-8 humanos analizados bloquearon la unión de IL-8 a los neutrófilos humanos.

### *Ensayo de expresión de CD11b en neutrófilos (Mac-1)*

El IL-8 humano a una concentración final de 10 nM fue preincubado con concentraciones variables de anticuerpos monoclonales a 4°C durante 30 minutos y a 37°C durante 30 minutos adicionales. Los neutrófilos (4 x 10<sup>5</sup>/pocillo) fueron expuestos a IL-8 en presencia o ausencia de anticuerpos a 4°C durante 90 minutos, y fueron incubados con CD11b anti-humano conjugado con PE de ratón (Becton Dickinson) durante 45 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas con PBS helado que contenía suero de becerro fetal del 2%. La fluorescencia fue medida en un analizador de células Becton Dickinson FACscan. Un anticuerpo monoclonal contra CD11b humano de ratón obtenido de R&D System, Inc. fue usado como control positivo mientras que IgG2 humano de mieloma purificado (Cal-biochem) fue usado como control negativo en los experimentos. Los niveles de expresión de CD11B en neutrófilos fueron medidos y expresados como el canal de fluorescencia promedio. El canal de fluorescencia promedio derivado a partir del anticuerpo de control negativo fue restado de las muestras experimentales.

20

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{fluorescencia promedio en presencia de IL-8 sólo} - \text{fluorescencia promedio en presencia de anticuerpos}}{\text{fluorescencia promedio en presencia de IL-8 sólo} - \text{fluorescencia promedio en presencia de IgG2 humano}} \times 100$$

25

Como se muestra en la Tabla 5, cinco de los seis anticuerpos bloquearon la sobre-regulación de CD11B en algún grado, bloqueando completamente tres de los cinco.

30

TABLA 5

35

*Inhibición de la expresión de CD11b en neutrófilos humanos por anticuerpos monoclonales contra IL-8*

Anticuerpo	Concentración (nM)	Inhibición de la expresión de CD11b (%)
anti-IL8 de R&D	333	100
I8K1.1	6	100
I8K2.1	10	60
I8K2.2	32	100
I8K4.2	3	10
I8K4.3	8	100
I8K4.5	5	0
IgG2 humano	33	0

50

La línea base de la expresión de CD11b es 670 (fluorescencia promedio) mientras que la expresión de CD11b en presencia de IL-8 humano 10 nM es 771.

55

### *Análisis de secuencia de transcripciones de inmunoglobulina derivadas a partir de hibridomas de anti-hIL-8*

Todas las secuencias fueron derivadas mediante la secuenciación directa de fragmentos de PCR generados a partir de las reacciones RT-PCR del ARN preparado a partir de los hibridomas D1.1, K2.2, K4.2 y K4.3, usando V<sub>H</sub> humano y V humano, cebadores específicos de familia (Marks *et al.* 1991; *Euro J. Immunol* **21**; 985-991) y un cebador específico para cualquier región constante  $\gamma$  2 humana (MG-40d; 5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGACTGT-3') o la región constante  $\kappa$  humana (HKP2; 1994 Green *et al.*, 1994; *Nature Genetics* **7**:13-21)). En las Figuras 16 A-H, ambas cadenas de los cuatro clones fueron secuenciadas y analizadas para generar la secuencia completa. Todas las secuencias fueron analizadas por alineamientos respecto al directorio de la secuencia V BASE, Tomlinson *et al.*, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido. Las regiones variable y de unión son indicadas por corchetes []. Los nucleótidos que contienen un "N" indican la incertidumbre en la secuencia generada.

65

## ES 2 304 786 T3

Basado en los alineamientos de la secuencia con las secuencias encontradas en la base de datos V BASE, la transcripción de la cadena pesada del hibridoma D1.1 tiene una región variable  $V_{H4-21}$  (DP-63) humana (7 mutaciones de punto fueron observadas comparado con la secuencia de la línea germinal), un segmento 21-1rc D humano, una región de unión a  $J_{H3}$  humano y una región constante  $\gamma 2$  humana. Véase la Figura 16A.

La transcripción de la cadena ligera de  $\kappa$  del hibridoma D1.1 está comprendida de una región variable  $\kappa$  humana con homología frente a  $V_{\kappa}$  08/018 (DPK1) (16 mutaciones de punto fueron observadas cuando se comparó con la secuencia de la línea germinal) una región de unión  $J_{\kappa 3}$  humana, y una región constante  $\kappa$  humana. Véase la Figura 16B.

Basado en los alineamientos de la secuencia con las secuencias encontradas en la base de datos V BASE, la transcripción de la cadena pesada del hibridoma K2.2 tiene una región variable  $V_{H3-30}$  humana (3 mutaciones de punto fueron observadas comparado con la secuencia de la línea germinal), un segmento IR3rc D humano, una región de unión  $J_{H4}$  humana y una región constante  $\gamma 2$  humana. Véase la Figura 16C.

La transcripción de la cadena ligera de  $\kappa$  del hibridoma K2.2 está comprendida de una región humana  $\kappa$  variable con la homología frente a  $V_{\kappa IV}$  (B3; DPK24) (9 mutaciones de punto fueron observadas comparado con la secuencia de la línea germinal), una región de unión de  $J_{\kappa 3}$  humana, y una región constante  $\kappa$  humana. Véase la Figura 16D.

Basado en los alineamientos de la secuencia con las secuencias encontradas en la base de datos V BASE la transcripción de la cadena pesada del hibridoma K4.2 tiene una región variable  $V_{H4-34}$  humana (8 mutaciones de punto fueron observadas comparado con la secuencia de la línea germinal), un segmento K1 D humano, una región de unión  $J_{H4}$  humana y una región constante  $\gamma 2$  humana. Véase la Figura 16E.

La transcripción de la cadena ligera de  $\kappa$  del hibridoma K4.2 está comprendida de una región variable  $\kappa$  humana con la homología frente a V, 08/018 (DPK1) (6 mutaciones de punto fueron observadas comparado con la secuencia de la línea germinal), una región de unión  $J_{\kappa 4}$  humano, y una región constante  $\kappa$  humana. Véase la Figura 16F.

Basado en los alineamientos de la secuencia con las secuencias encontradas en la base de datos V BASE la transcripción de la cadena pesada del hibridoma K4.3 tiene una región variable  $V_{H5-51}$  (DP-73) humano, un segmento M5-a/M5-b D humano, una región de unión  $J_{H4}$  humana y una región constante  $\gamma 2$  humana. Véase la Figura 16G.

La transcripción de la cadena ligera de  $\kappa$  del hibridoma K4.3 está comprendida de una región variable  $\kappa$  humana con la homología frente a V, 02/012 (DPK9) (9 mutaciones de punto fueron observadas comparado con la secuencia de la línea germinal), una región de unión  $J_{\kappa 4}$  humana, y una región constante  $\kappa$  humana. Véase la Figura 16H.

### *Depósitos biológicos*

El yH1C contenido en *S. cerevisiae* fue depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC"), Parklawn Drive 12301, Rockville MD 20852, EE.UU., el 26 de abril de 1996, y se le asignó el n°. de catálogo ATCC 74367. El depósito de este YAC tiene sólo objetivos ejemplares, y no debe ser tomado como una admisión por el solicitante de que tal depósito es necesario para la habilitación de la materia reivindicada.

Con respecto a todos los Estados designados en los cuales tal acción es posible y al grado que está legalmente permitido conforme a la ley del Estado designado, se solicita que una muestra del microorganismo depositado esté disponible sólo para su emisión frente a un experto independiente, conforme a la legislación de la patente relevante, por ejemplo, la norma EPC 28 (4).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno que se une específicamente a IL-8 seleccionado a partir del grupo que consiste en:

- (a) un anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos de la región variable, el segmento D y la región que se une expuesta en la figura 16A, y en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos de la región variable y la región que se une expuesta en la figura 16B;
- (b) un anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos de la región variable, el segmento D y la región que se une expuesta en la figura 16C, y en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos de la región variable y la región que se une expuesta en la figura 16D;
- (c) un anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos de la región variable, el segmento D y la región que se une expuesta en la figura 16E, y en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos de la región variable y la región que se une expuesta en la figura 16F; y
- (d) un anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos de la región variable, el segmento D y la región que se une expuesta en la figura 16G, y en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos de la región variable y la región que se une expuesta en la figura 16H.

2. Un anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno que se une específicamente a IL-8 seleccionado a partir del grupo que consiste en:

- (a) un anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la figura 16A, y en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la figura 16B;
- (b) un anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la figura 16C, y en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la figura 16D;
- (c) un anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la figura 16E, y en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la figura 16F; y
- (d) un anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la figura 16G, y en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la figura 16H.

3. El anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno de la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno reduce la expresión de MAC-1 inducida por IL-8 (CD11b) en neutrófilos.

4. Una célula que produce el anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. La célula de la reivindicación 4, en la que dicha célula se deriva a partir de un mamífero no humano inmunizado con IL-8, en el que dicho mamífero es capaz de producir un anticuerpo totalmente humano frente a un antígeno de interés.

6. La célula de la reivindicación 4 ó 5, en la que la célula expresa los cADN que codifican dicho anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno.

7. Un método para producir el anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de cultivar la célula de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 y recuperar dicho anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno.

8. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno de las reivindicaciones 1-3.

## ES 2 304 786 T3

9. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.

10. La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5

11. El uso del anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para reducir la unión de IL-8 a neutrófilos.

10

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que IL-8 debe ser puesto en contacto con el anticuerpo o la parte de éste que se une al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

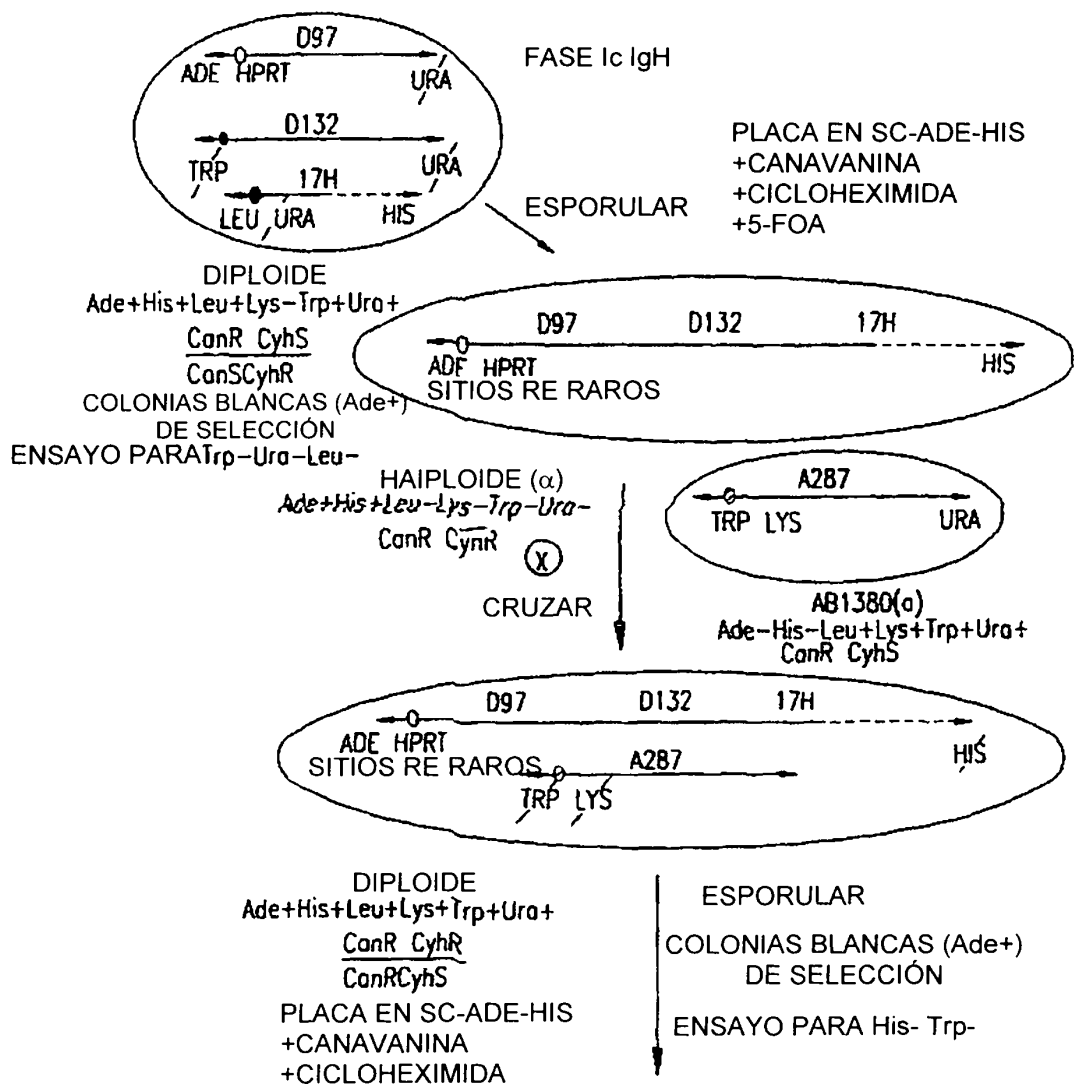
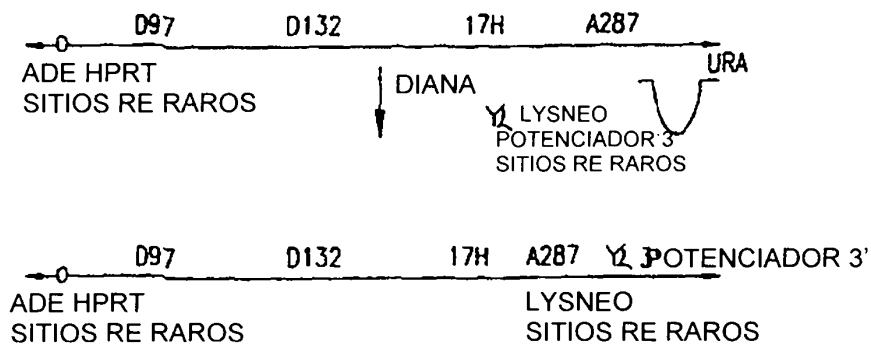


FIG. 1



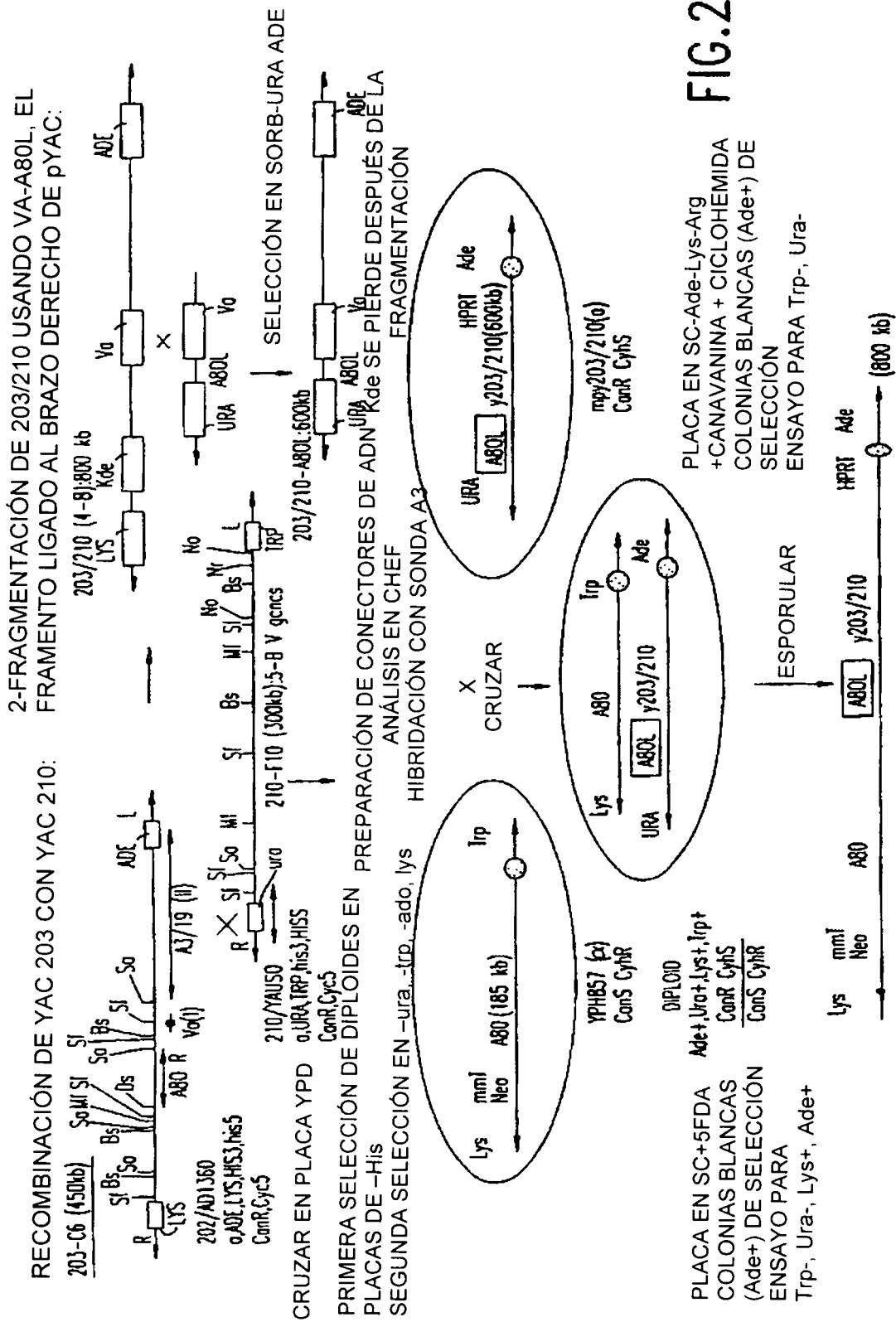


FIG.2

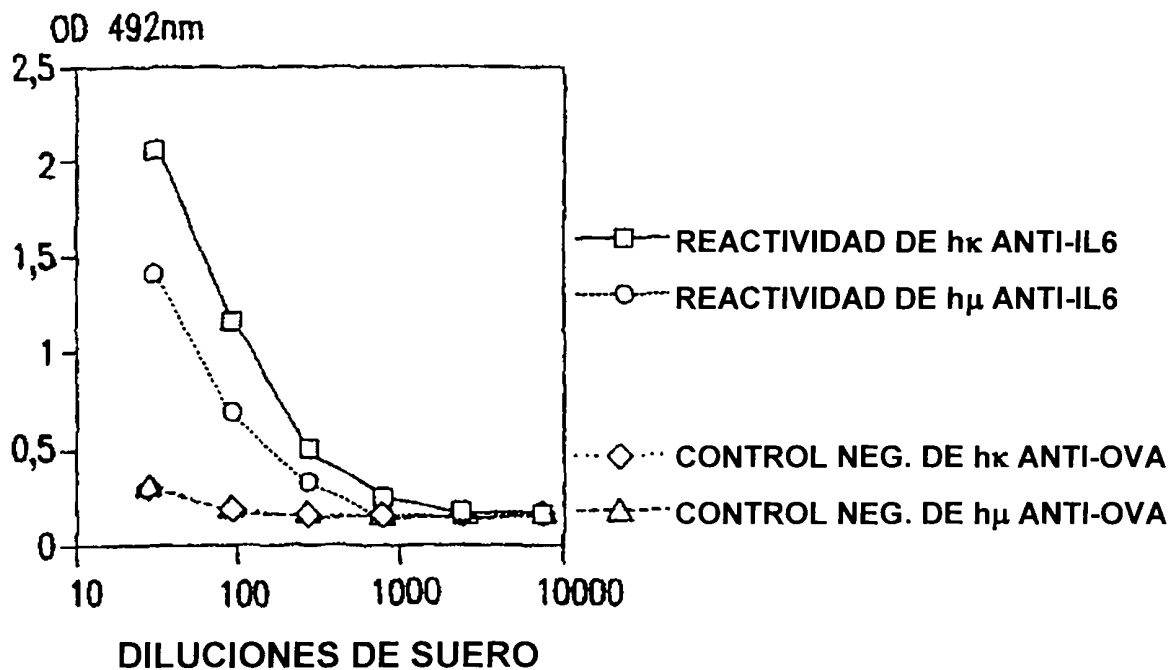


FIG.3

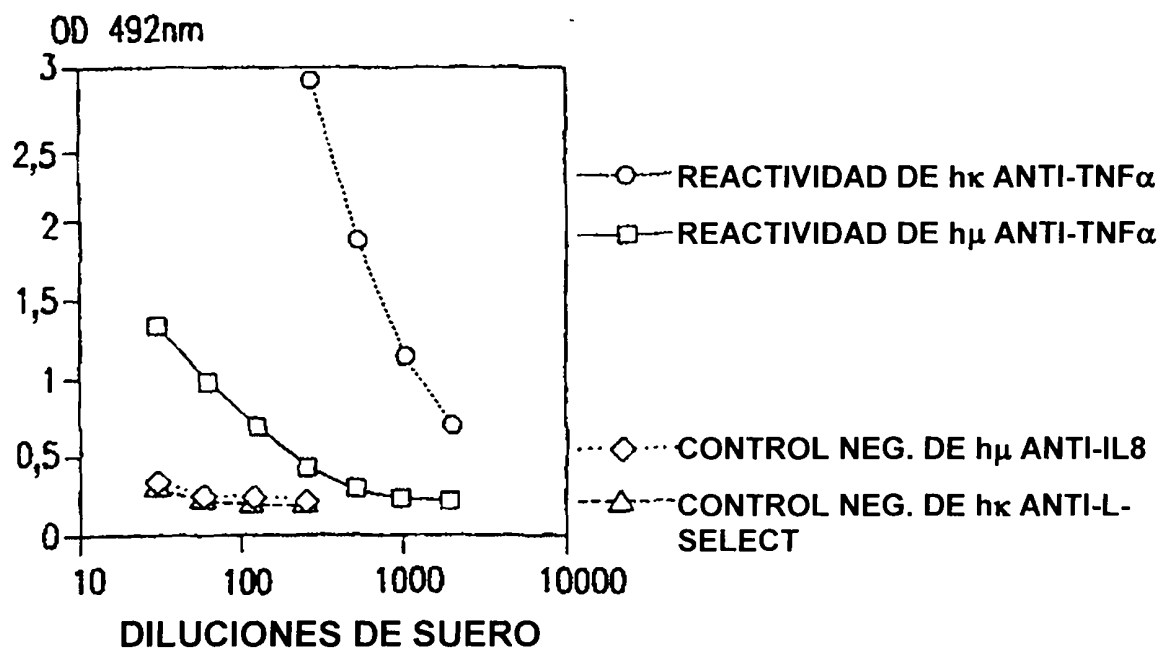


FIG.4

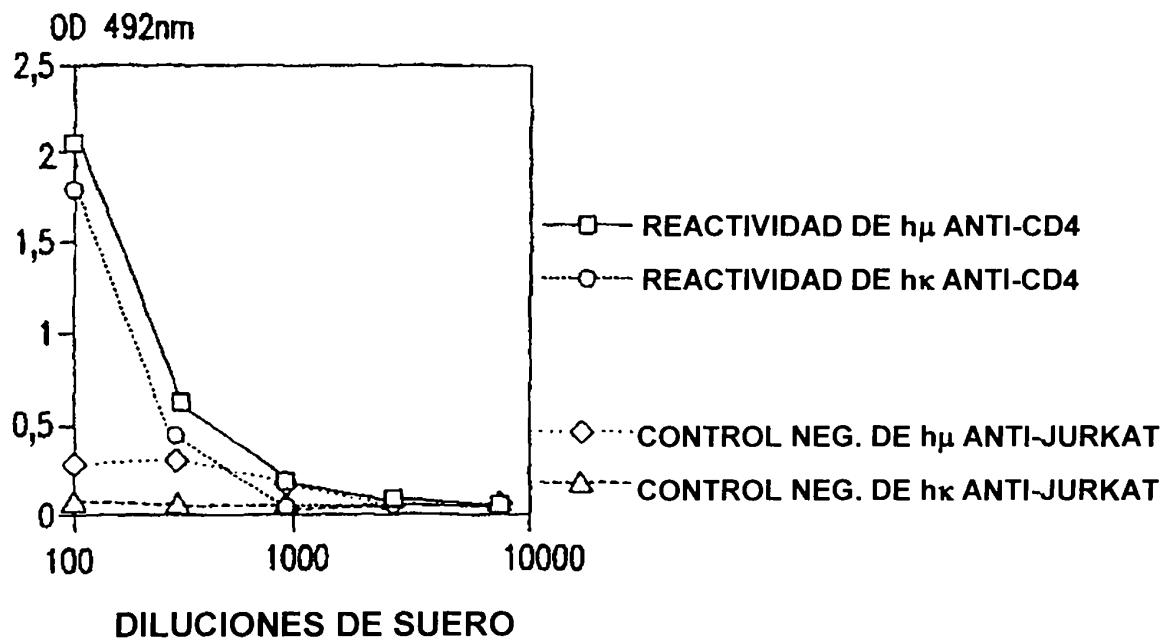


FIG.5

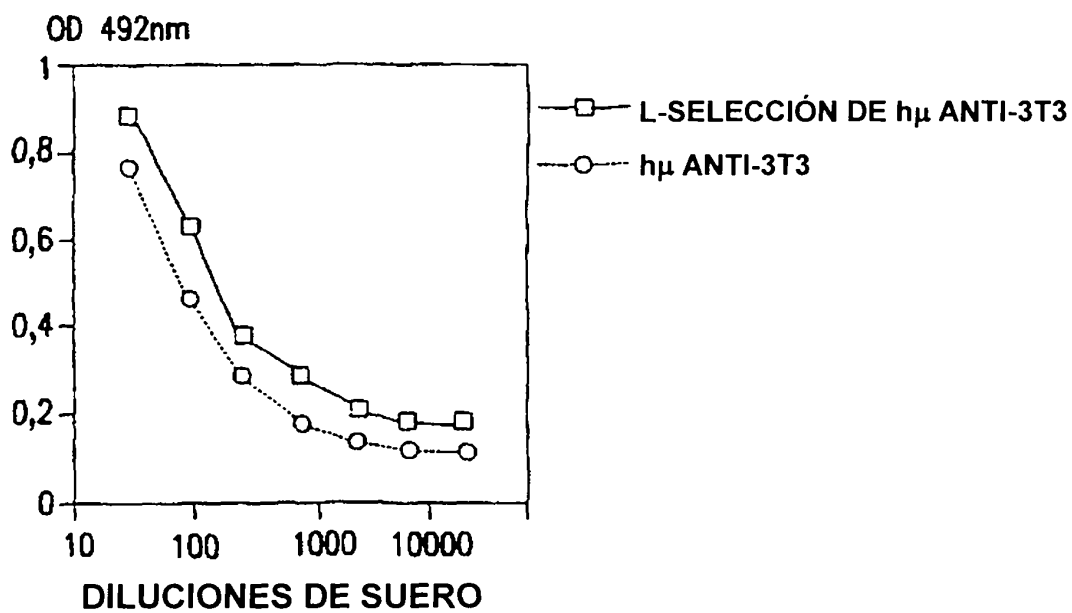


FIG.6



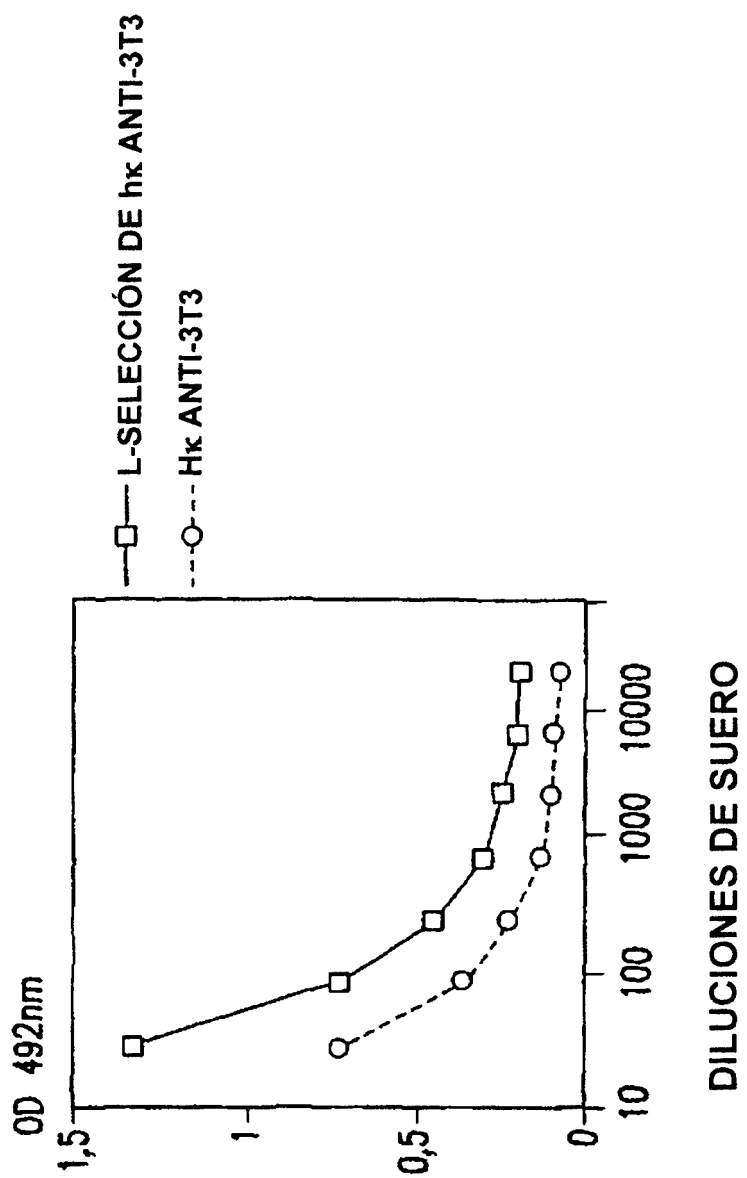
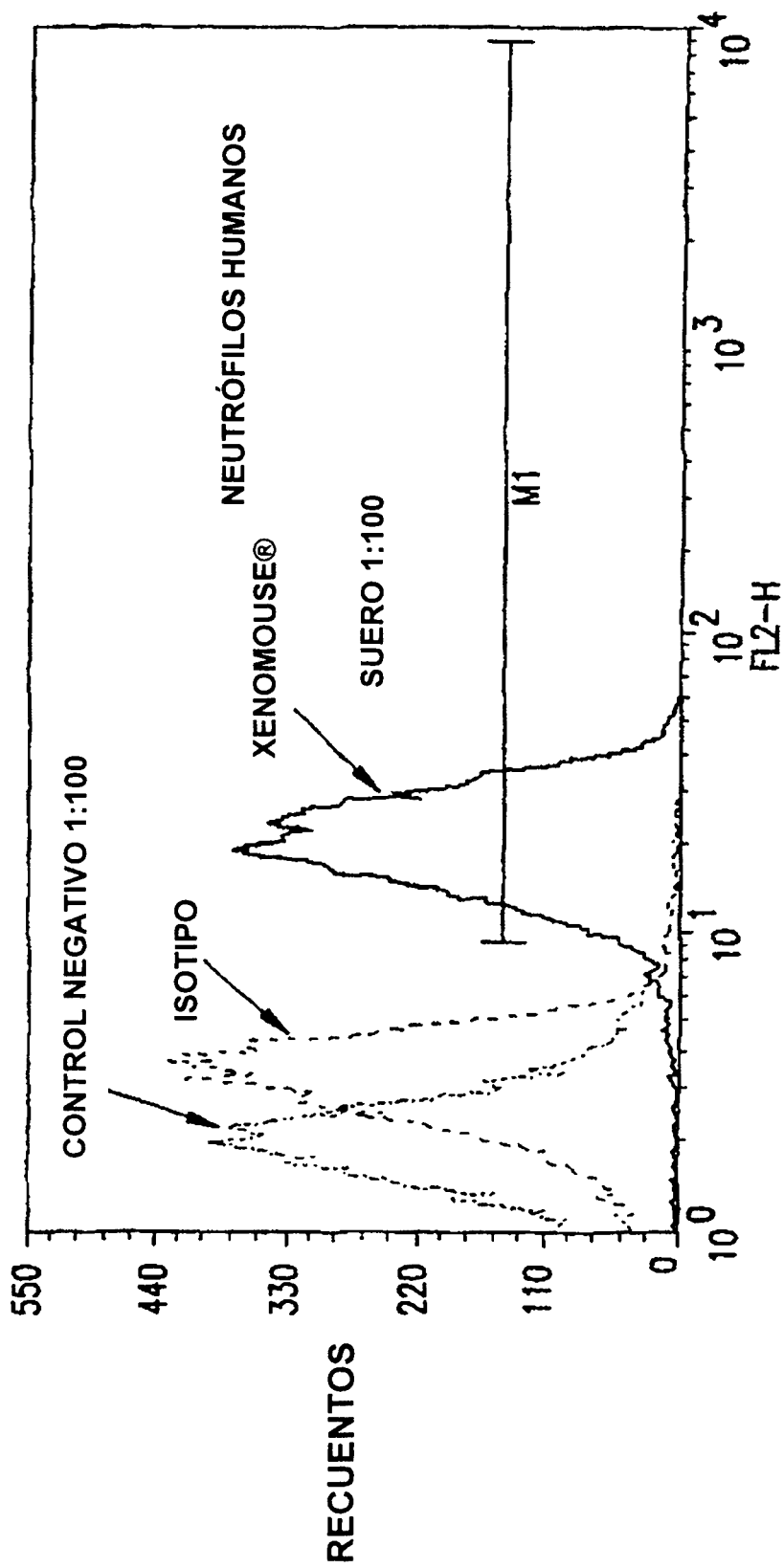


FIG.7



PE  $\kappa$  ANTI-HUMANO DE RATÓN

FIG.8

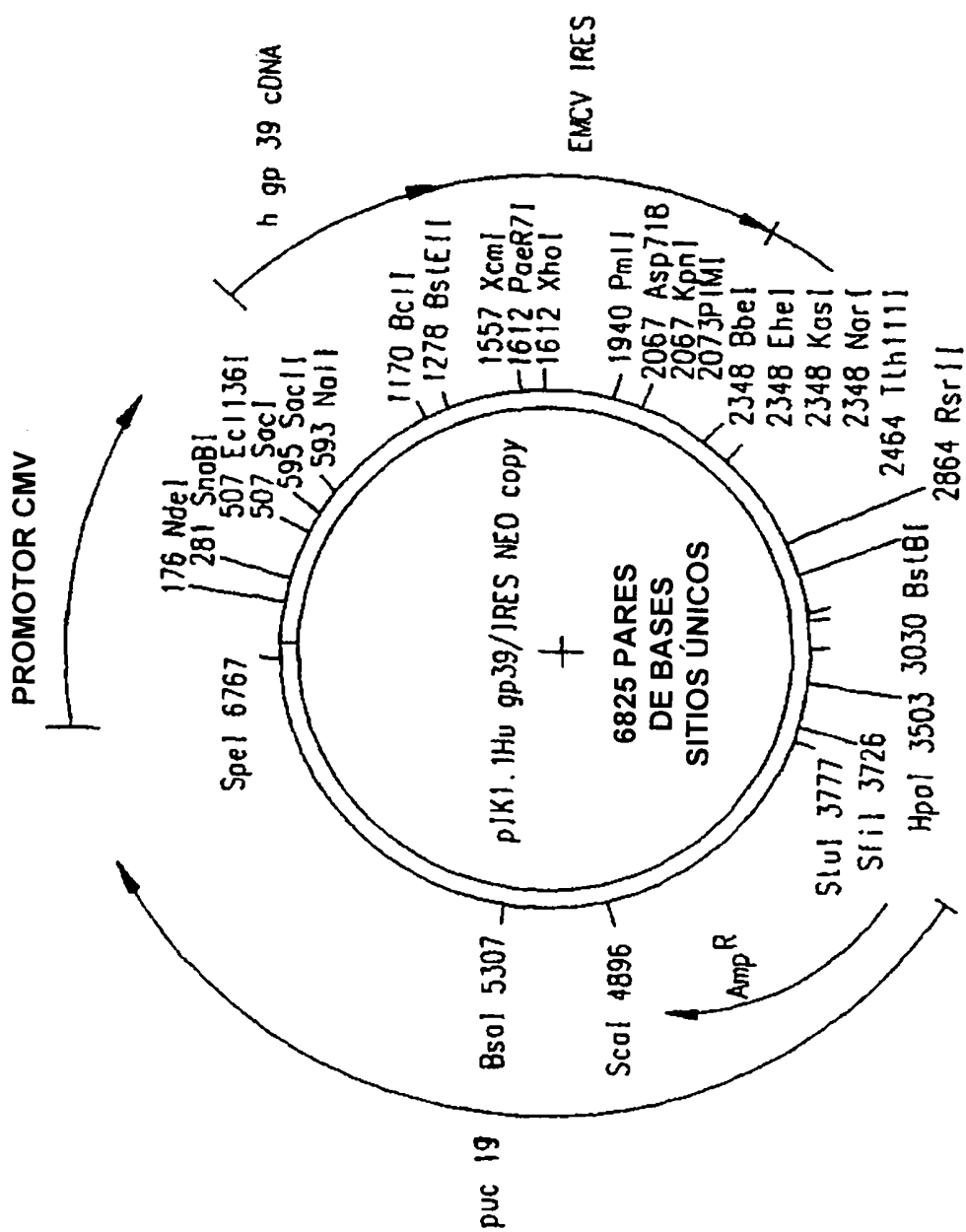


FIG.9

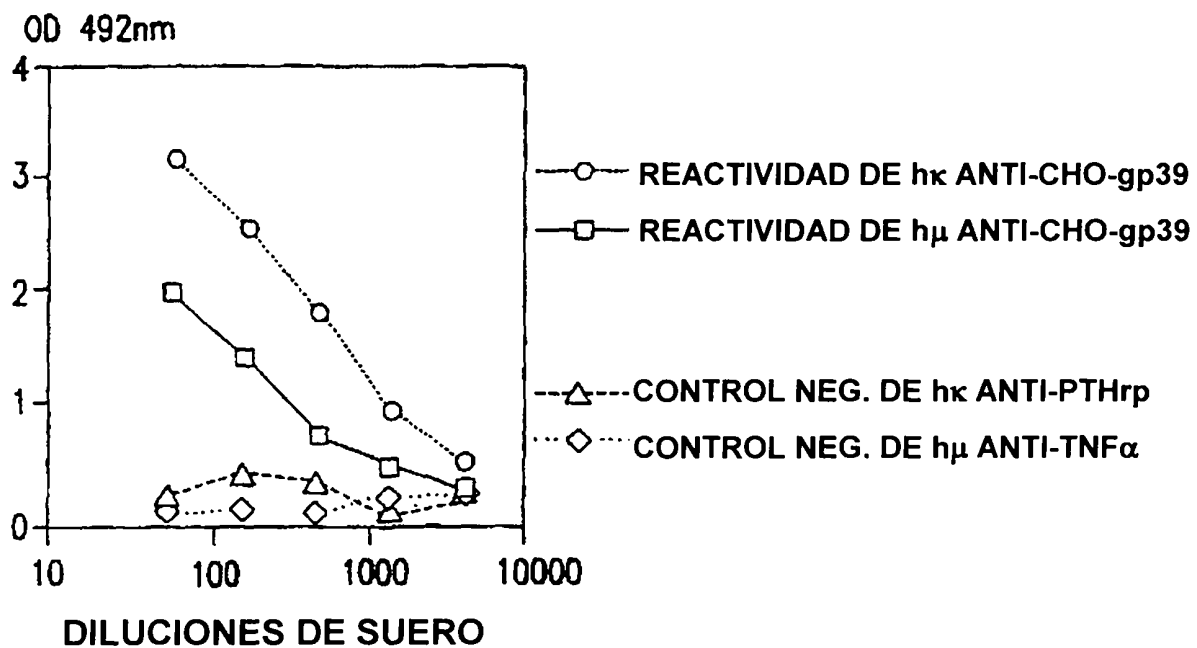


FIG.10

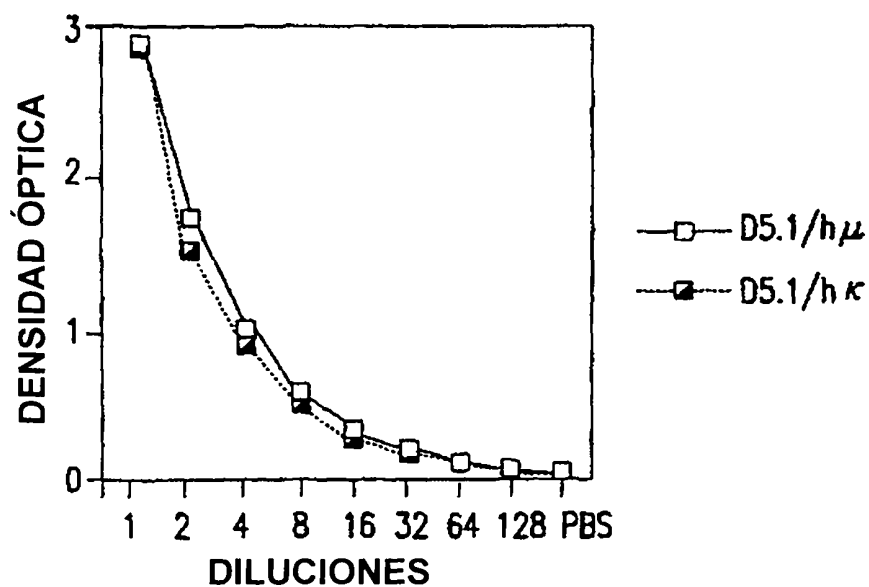


FIG.11

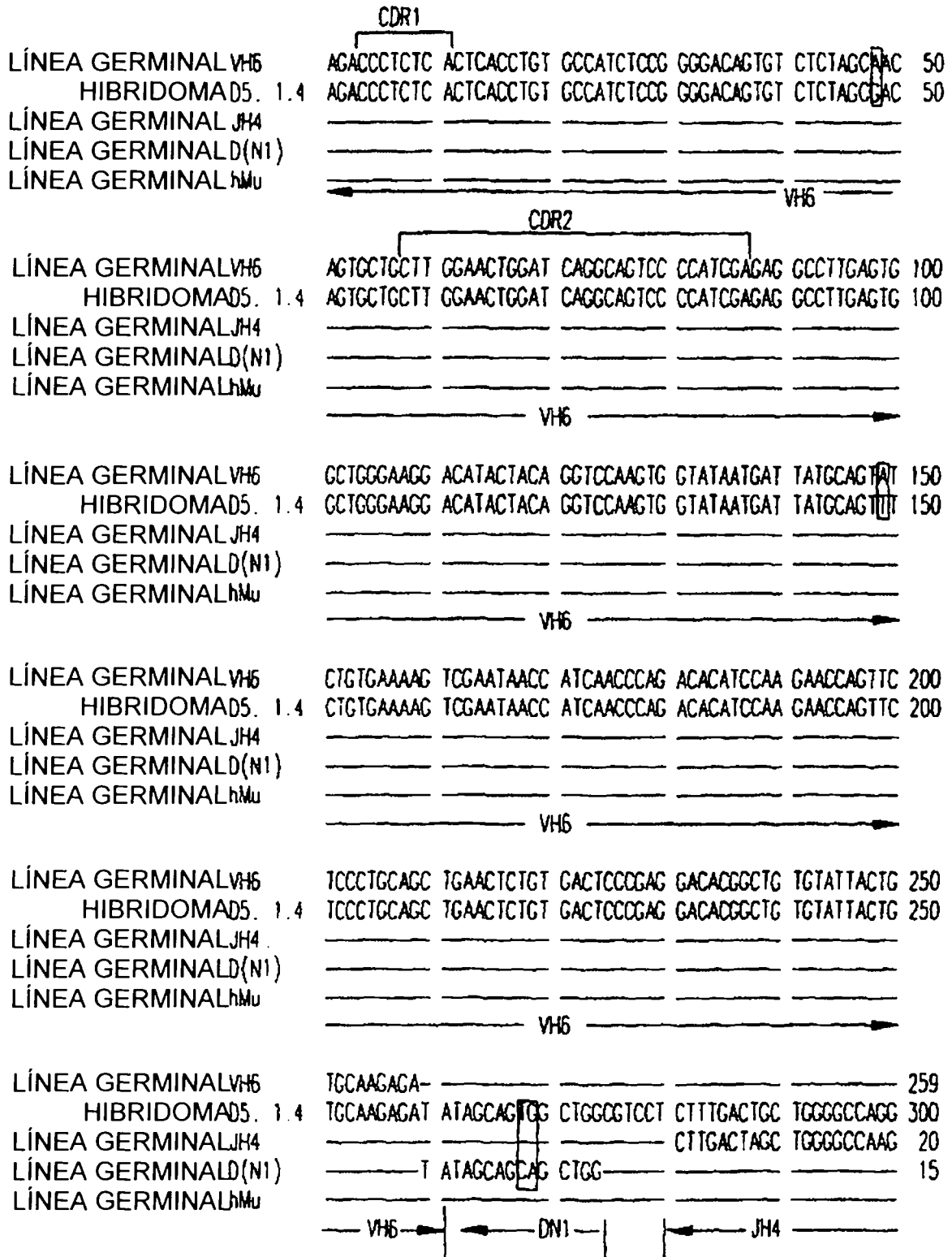


FIG.12A

ES 2 304 786 T3

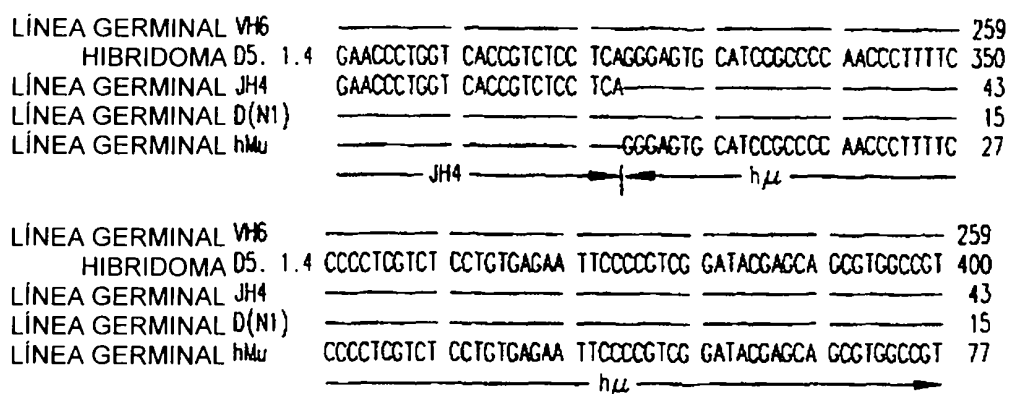


FIG.12B

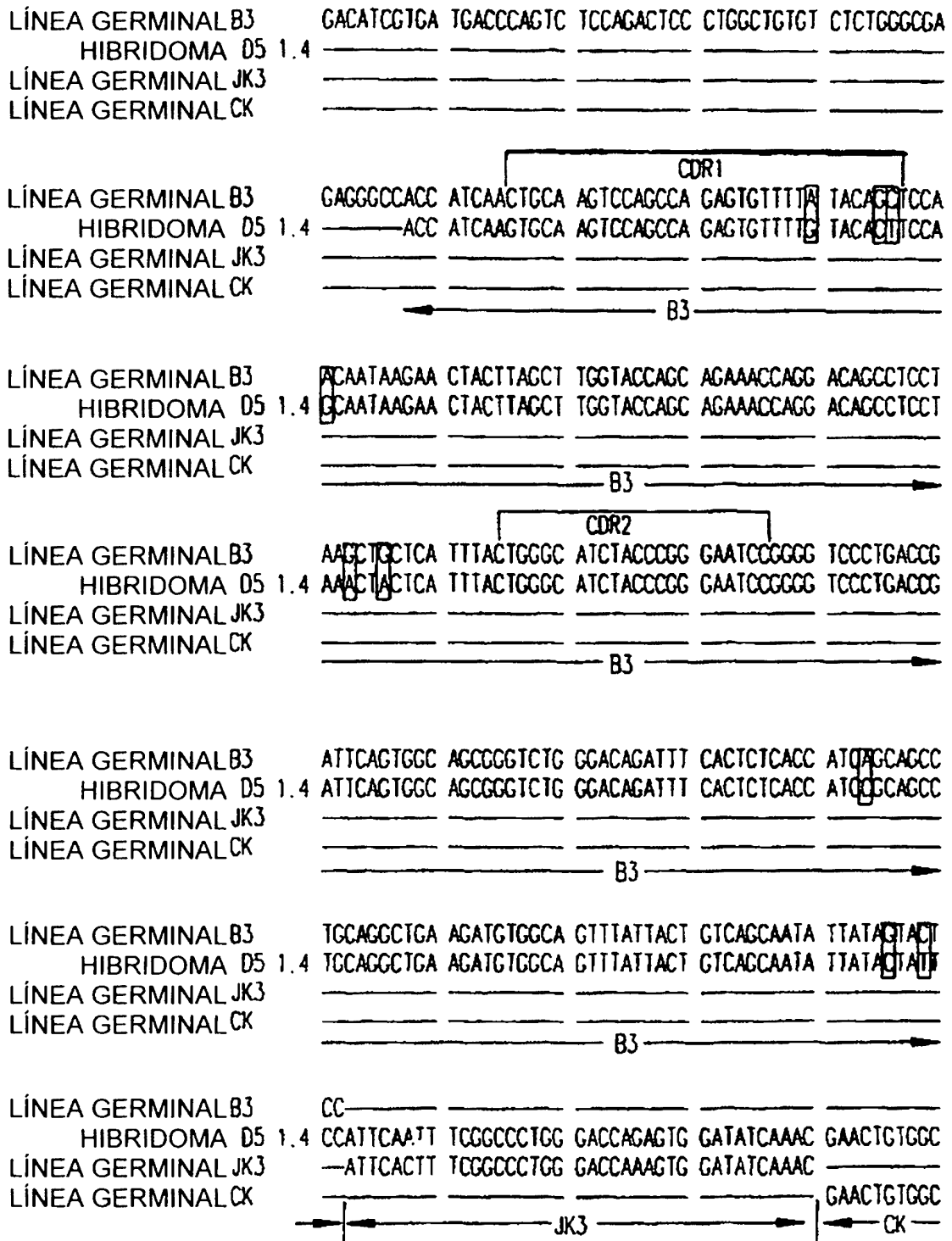


FIG.13A

ES 2 304 786 T3

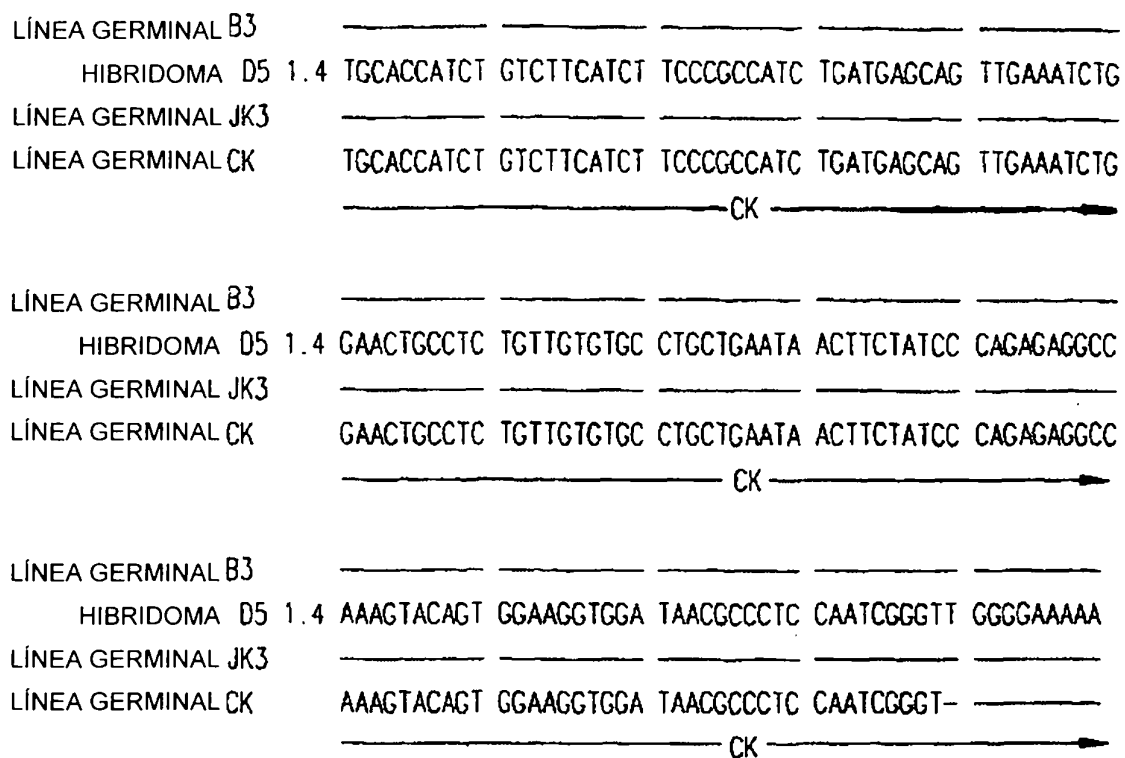


FIG.13B



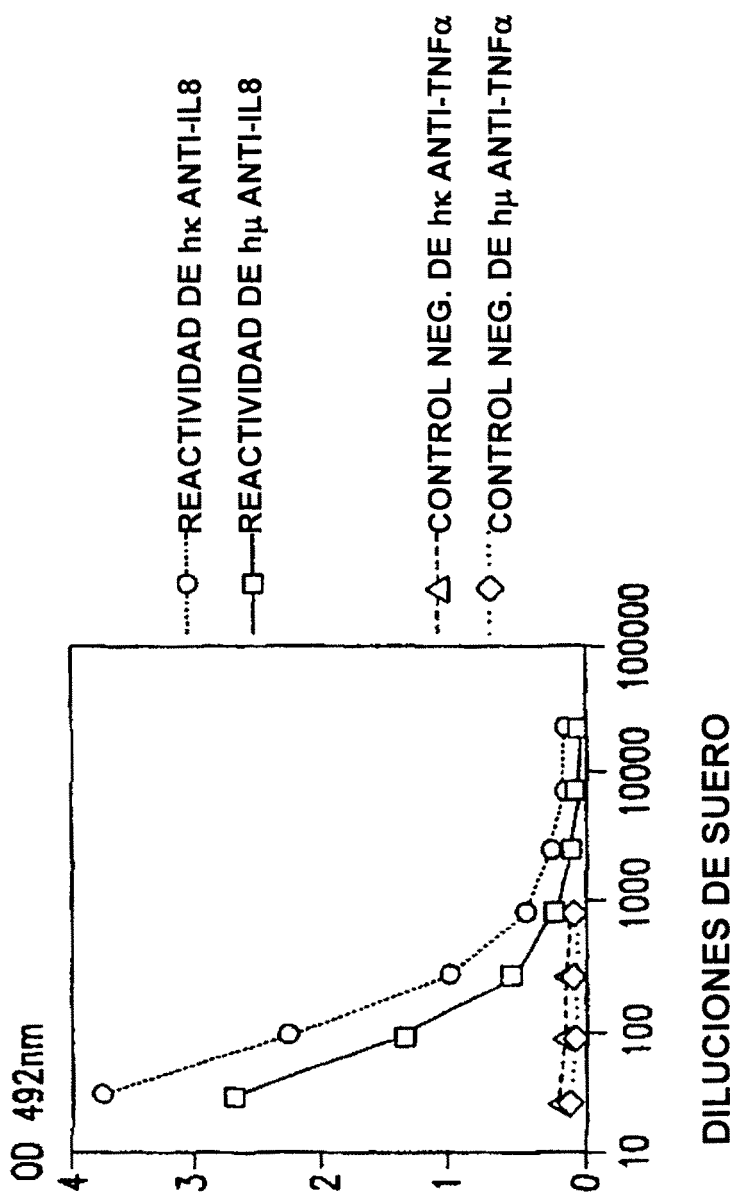


FIG.14

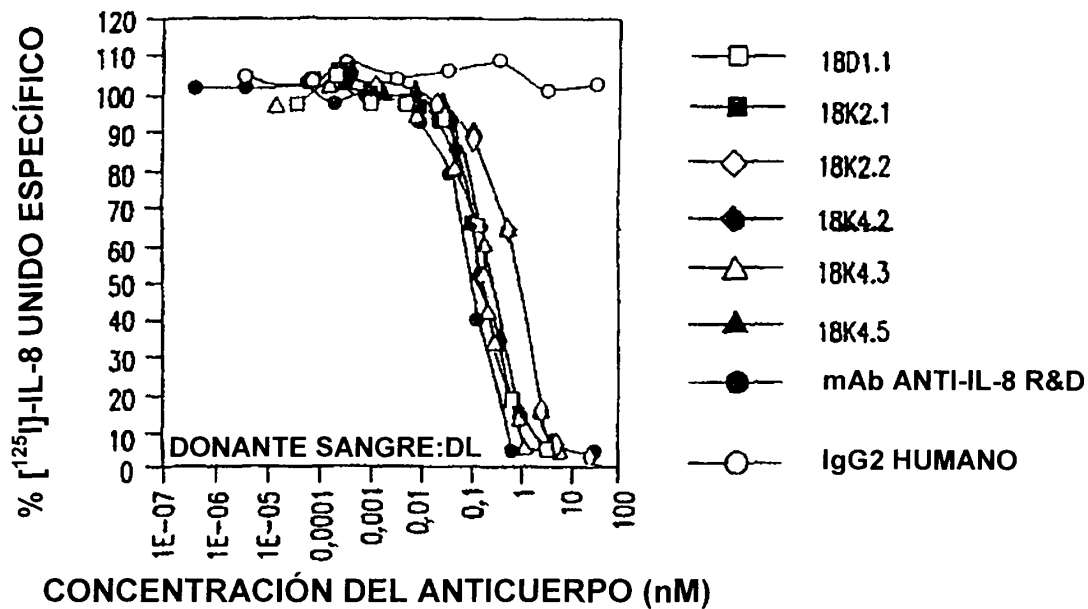


FIG.15A

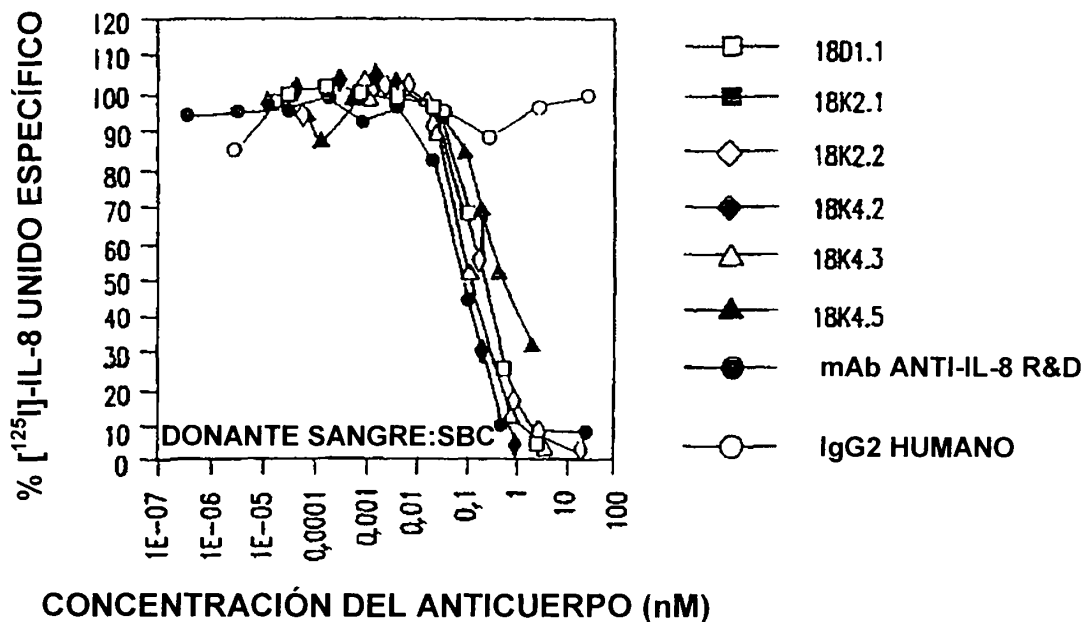


FIG.15B

ES 2 304 786 T3

[CCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGCCTTCAGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGCC  
AGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCAAAGTGGGAAGCACCAATTACAA  
CCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCATCATATCAATAGACACGTCCAAGACCCAGTTCTCCCTGAAGT  
TGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA][GACTCCCC][ATGCT  
TTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAG]CCTCCACCAAGGGCCCATCGG  
TCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGC(GC)GCCCTGGGCTGCCTG  
GTCAAGGACTACTTCC

## FIG. 16A

[CAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTC  
AGGACATTAGTAAGTTTTTAAGTTGGTTTCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAACTCCTGATC  
TACGGTACATCCTATTTGGAAACCGGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGA  
TTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACATATTTCTGTAACAGNATG  
ATGATCTCCC][ATACACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAAC]GAACTGTGGCTGCAC  
CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC  
TGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC

## FIG. 16B

ES 2 304 786 T3

[AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGNT  
CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGAAATATCATATGATGGAAGTAATAAA  
TACTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGACTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT  
ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA][CCGAC  
TGGGGAT][CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG]CCTCCACCAAGG  
GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGC(GC)GGCCCT  
GGGCTGCCTGGTCCAAGGACTACTTCCCCCGAACC GG TGACGGTGTGCTGGA ACTCAGGCGCTC  
TGACCAG

## FIG. 16C

[CTGACNCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGT  
CCAGCCAGAGTGTTTTATACATCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCA  
GGACAGTCTCCTAAACTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGAAATCCGGGGTCCCTGACCGATT  
CAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTG  
GCAGTTTATTACTGTCAACAGTATTATGATACTCC][ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGG  
ATATCAAAC]GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA  
TCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTG  
GAAGGTGGNTAACGCCCCA

## FIG. 16D

[TCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGTGGTFACTACTGGACCTGGATCCGCCAGCC  
CCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAAATCATTTCATCATGGAAACACCAACTACAACCCG  
TCCCTCAAGAGTCGAGTCTCCATATCAGTTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGACACTGAG  
CTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG][GGGAGCAGTGGCTGCG][T  
TTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG]CCTCCACCAAGGGCCCATCGGT  
CTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGC(GC)GGCCCTGGGCTGCCTG  
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGC  
GTGCACACCTTCCCA

FIG. 16E

[TGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGC  
GAGTCAGGACATTAGTAACTATTTAAATTGGTATCAACAGAAAGCAGGGAAAGCCCTAAGGTCC  
TGATCTACGCTGCATCCAATTTGGAAGCAGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGAAGTGGATCTGGG  
ACAGATTTTACTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTATTGTCAACA  
CTATGATAATCT]A[CTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTAGAGATCAAAC]GAACTGTGGCTGC  
ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGACTGCCTCTGTTGTGTG  
CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGG

FIG. 16F

AGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTG  
CGCCAGATGCCCGGGAAAGGCC TGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCA  
GATACAGCCCGTCC TTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCCGCTA  
CCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCC TCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACA][GGACGG  
TG][ACTCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTACCGTCTCCTCAG]CCTCCACCAAGGG  
CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGC(GC)GGCCCTG  
GGCTGCCTGGTCCAAGGACTACTTCCCCGAAACCGGTGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGCTCT  
GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCACTGCCA

FIG. 16G

TGTCTGCATCTATTGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAACTA  
TTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTTCTGATCTATGGTGCATCCAGT  
TTGGAAAGTGGGGTCCCATCANGGTT CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT  
CAGCAGCCTGCAACCTGNGGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTAACCC]T[CTC  
ACTTTCGGCGGNGGGACCAANGTGGAGATCAAAC]GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT  
TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT  
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA

FIG. 16H

# ES 2 304 786 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Abgenix, Inc.

5 <120> ANTICUERPOS HUMANOS DERIVADOS A PARTIR DE XENORATONES INMUNIZADOS

<130> EP37734HVpau

10 <140> EP 05 028 220.1

<141> 2005-12-21

<150> EP 96 913 247.1

15 <151> 1996-04-29

<150> PCT/US96/05928

20 <151> 1996-04-29

<150> 08/430,938

<151> 1995-04-27

25 <160> 21

<170> PatentIn Ver. 3.3

30 <210> 1

<211> 259

<212> ADN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

40 **agaccctctc actcacctgt gccatctccg gggacagtgt ctctagcaac agtgctgctt 60**  
**ggaactggat caggcagtcc ccatcgagag gccttgagtg gctgggaagg acatactaca 120**  
**ggtccaagtg gtataatgat tatgcagtat ctgtgaaaag tcgaataacc atcaaccag 180**  
**acacatcCaa gaaccagttc tccctgcagc tgaactctgt gactcccgag gacacggctg 240**  
**tgtattactg tgcaagaga 259**

45 <210> 2

<211> 400

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50

<400> 2

55 **agaccctctc actcacctgt gccatctccg gggacagtgt ctctagcgac agtgctgctt 60**  
**ggaactggat caggcagtcc ccatcgagag gccttgagtg gctgggaagg acatactaca 120**  
**ggtccaagtg gtataatgat tatgcagttt ctgtgaaaag tcgaataacc atcaaccag 180**  
**acacatcCaa gaaccagttc tccctgcagc tgaactctgt gactcccgag gacacggctg 240**  
**tgtattactg tgcaagagat atagcagtgg ctggcgtcct ctttgactgc tggggccagg 300**  
**gaaccctggt caccgtctcc tcagggagtg catccgcccc aacccttttc cccctcgtct 360**  
**cctgtgagaa ttccccgtcg gatacggagca gcgtggccgt 400**

60 <210> 3

<211> 43

<212> ADN

65 <213> *Homo sapiens*

# ES 2 304 786 T3

<400> 3

cttgactagc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcc tca

43

5

<210> 4

<211> 15

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

15 tatagcagca gctgg

15

<210> 5

<211> 77

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

25 **gggagtgcac ccgccccaac ccttttcccc ctctgtctct gtgagaattc cccgtcggat 60**  
**acgagcagcg tggccgt 77**

<210> 6

30 <211> 302

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 6

**gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60**  
**atcaactgca agtccagcca gagtggttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120**  
**tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgtca tttactgggc atctaccg 180**  
**gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagatt cactctacc 240**  
**atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300**  
**cc 302**

<210> 7

45 <211> 442

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 7

**accatcaagt gcaagtccag ccagagtgtt ttgtacactt ccagcaataa gaactactta 60**  
**gcttgggtacc agcagaaacc aggacagcct cctaaactac tcatttactg ggcactctacc 120**  
**cgggaatccg gggtccttga ccgattcagt ggcagcgggt ctgggacaga tttcactctc 180**  
**accatccgca gcctgcaggc tgaagatgtg gcagtttatt actgtcagca atattatact 240**  
**attccattca atttcggccc tgggaccaga gtggatatca aacgaactgt ggctgcacca 300**  
**tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgtttgt 360**  
**tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgggaagg ggataacgcc 420**  
**ctccaatcgg gttggggaaa aa 442**

<210> 8

<211> 38

<212> ADN

65 <213> *Homo sapiens*



ES 2 304 786 T3

<400> 8

attcactttc ggccttgga ccaaagtga tatcaaac

38

5

<210> 9

<211> 149

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

15 **gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg 60**  
**gaactgcctc tgttggtgtc ctgctgaata acrtctatcc cagagaggcc aaagtacagt 120**  
**ggaagggtga taacgccctc caatcgggt 149**

<210> 10

20 <211> 400

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 10

**cctgtccctc acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat 60**  
**ccgccagccc ccaggggaagg gactggagtg gattggggaa atcaatcaaa gtggaaggca 120**

30

**ccaattacaa cccgtccctc aagagtcgag tcatcatatc aatagacacg tccaagacct 180**  
**agttctccct gaagttgagc tctgtgaccg ccgcggacac ggctgtgtat tactgtgcga 240**  
**gagagactcc ccatgctttt gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc gtctcttcag 300**  
**cctccaccaa gggcccctcg gtcttccccc tggcgccttg ctccaggagc acctccgaga 360**  
**gcacagcgcg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc 400**

35

<210> 11

<211> 444

<212> ADN

40 <213> *Homo sapiens*

<220>

45 <221> base\_modificada

<222> (255)

<223> a, c, g, t, desconocida u otra

50 <400> 11

**cagtctccat cctccctgtc tgcattctgta ggcgacagag tcaccatcac ttgccaggcg 60**  
**agtcaggaca ttagtaagtt ttaagttgg ttcaacaga aaccaggga agcccctaaa 120**  
**ctcctgatct acggtacatc ctatttggaa accgggtcc catcaagttt cagtggaagt 180**  
**ggatctggga cagattttac tctcaccatc agcagcctgc agcctgaaga tgttgcaaca 240**  
**tatttctgta acagnatgat gatctcccat acactttcgg ccctgggacc aaagtggata 300**  
**tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga 360**  
**aatctggaac tgcctctggt gtgtgcctgc tgaataactt ctatccaga gaggccaag 420**  
**tacagtggaa ggtggataac gccc 444**

60

<210> 12

<211> 453

<212> ADN

65 <213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 304 786 T3

<221> base\_modificada

<229> (64)

<223> a, c, g, t, desconocida u otra

5

<400> 12

```

aggtccctga gactctcctg tgcagcctct ggattcacct tcagtagcta tggcatgcac 60
tggntccgcc aggctccagg caaggggctg gagtgggtgg cagaaatatc atatgatgga 120
10 agtaataaat actatgtaga ctccgtgaag ggccgactca ccatctccag agacaattcc 180
aagaacacgc tgtatctgca aatgaacagc ctgagagctg aggacacggc tgtgtattac 240
tgtgcgagag accgactggg gatctttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 300
tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttcccctgg cgccctgctc caggagcacc 360
tccgagagca cagcgcggcc ctgggtctgc tggtccaagg actacttccc ccgaaccggt 420
15 gacggtgtcg tggaactcag gcgctctgac cag 453

```

<210> 13

<211> 470

20

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

25

<221> base\_modificada

<222> (6)

<223> a, c, g, t, desconocida u otra

30

<220>

<221> base\_modificada

<222> (460)

35

<223> a, c, g, t, desconocida u otra

<400> 13

```

ctgacncagt ctccagactc cctggctgtg tctctgggcg agagggccac catcaactgc 60
40 aagtccagcc agagtgtttt atacatctcc aacaataaaa ctacttagct tggtaccagc 120
agaaaccagg acagtctcct aaactgctca tttactgggc atctaccggg aatcccggg 180
tcctgagcc attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc atcagcagcc 240

```

45

```

tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacagta ttatgatact ccattcactt 300
tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaac gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct 360
tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata 420
acttctatcc cagagagggc aaagtaacgt ggaaggtggn taacgccccca 470

```

50

<210> 14

<211> 462

<212> ADN

55

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

```

tcctcacct gcgctgtcta tggtgggtcc ttcagtggtt actactggac ctggatccgc 60
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt ggggaaatca ttcatcatgg aaacaccaac 120
tacaaccctg ccctcaagag tcgagtctcc atatcagttg acacgtccaa gaaccagttc 180
tcctgacac tgagctctgt gaccgcccgc gacacggctg tgtattactg tgcgagaggg 240
ggagcagtg ctgcgtttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctcctcagcc 300
tcaccaag gcccatcgg cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 360
65 acagcgcggc cctgggtgc ctggtcaagg actacttccc ccgaaccggt gacggtgtcg 420
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc ca 462

```

## ES 2 304 786 T3

<210> 15

<211> 437

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

```

10      tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgcc 60
      aggcgagtca ggacattagt aactatftaa attggtatca acagaaagca gggaaagccc 120
      ctaaggtcct gatctacgct gcatccaatt tggaaagcagg ggtcccatca aggttcagtg 180
      gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatacagcag cctgcagcct gaagatattg 240
      caacatatta ttgtcaacac tatgataatc tactcacttt cggcggaggg accaaggtag 300
      agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt 360
15      tgaaatctgg actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatcca gagaggccaa 420
      agtacagtgg aagggtgg 437

```

<210> 16

20 <211> 477

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 16

```

      agtctctgaa gatctcctgt aagggttctg gatacagctt taccagctac tggatcggct 60
      gggtgcgcca gatgcccggg aaaggcctgg agtggatggg gatcatctat cctggtgact 120
      ctgataccag atacagcccg tccttccaag gccaggtcac catctcagcc gacaagtcca 180
30      tcagcaccgc ctacctgcag tggagcagcc tgaaggcctc ggacaccgcc atgtattact 240
      gtgcgagaca ggacggtgac tcctttgact actggggcca gggaaaccctg gtcaccgtct 300
      cctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc gccctgtctc aggagcact 360
      ccgagagcac agcgcggccc tgggtgcct ggtccaagga ctacttcccc cgaaccgggtg 420
      acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc actgcca 477

```

35

<210> 17

<211> 410

<212> ADN

40 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> base\_modificada

45

<222> (151)

<223> a, c, g, t, desconocida u otra

<220>

50

<221> base\_modificada

<222> (212)

<223> a, c, g, t, desconocida u otra

55

<220>

<221> base\_modificada

<222> (270)

60

<223> a, c, g, t, desconocida u otra

<220>

<221> base\_modificada

65

<222> (279)

<223> a, c, g, t, desconocida u otra

# ES 2 304 786 T3

<400> 17  
 tgtctgcatc tattggagac agagtcacca tcacttgccg ggcaagtcag agcattagca 60  
 actatTTaaa ttggtatcag cagaaaccag ggcaaagccc ctaagttcct gatctatggt 120  
 5 gcatccagtt tggaaagtgg ggtcccatca nggttcagtg gcagtggtac tgggacagat 180  
 ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct gnggattttg caacttacta ctgtcaacag 240  
 agttacagta accctctcac tttcggcggn gggaccaang tggagatcaa acgaactgtg 300  
 gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc 360  
 tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca 410

10 <210> 18  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

20 <400> 18  
 ctctgtgaca ctctcctggg agtt 24

25 <210> 19  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

35 <400> 19  
 gaaacgacac tcacgcagtc tccagc 26

40 <210> 20  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

50 <400> 20  
 ttttctttgt tgccgttggg gtgc 24

55 <210> 21  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

65 <400> 21  
 gctgaggag tagagtctg aggactgt 28