

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 755**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2008 E 08848354 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2224954**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a células dendríticas y epiteliales humanas 205 (DEC-205)**

30 Prioridad:

07.11.2007 US 2253 P

10.09.2008 US 191551 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.03.2014

73 Titular/es:

**CELLEX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
119 FOURTH AVENUE
NEEDHAM, MA 02494-2725, US**

72 Inventor/es:

**KELER, TIBOR;
HE, LIZHEN;
RAMAKRISHNA, VENKY y
VITALE, LAURA A.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 445 755 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 que se unen a células dendríticas y epiteliales humanas 205 (DEC-205)

5 **Solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/002253, presentada el 7 de noviembre de 2007 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/191551, presentada el 10 de septiembre de 2008.

10

Antecedentes de la invención

Las células dendríticas (DC) son células especializadas del sistema inmunitario. Las DC tienen la capacidad única de iniciar respuestas de linfocitos T y B primarias y secundarias presentando antígenos en forma de péptidos unidos con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de superficie celular. La función de presentación de antígenos de las células dendríticas se ha correlacionado con la expresión de alto nivel del receptor de células dendríticas y epiteliales humanas 205 (DEC-205) (Jiang *et al.* (1995) *Nature* 375(11)151).

15

DEC-205 es un receptor endocítico hallado principalmente en células dendríticas, pero también se encuentra en linfocitos B, capilares cerebrales, estroma de la médula ósea, epitelios de vellosidades intestinales y vías respiratorias pulmonares, así como el epitelio cortical del timo y las células dendríticas en las áreas de linfocitos T de órganos linfoides periféricos. DEC-205 se expresa a altos niveles en DC en las áreas de linfocitos T de órganos linfoides (Kraal *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 981; Witmer-Pack *et al.* (1995) *Cell. Immunol.* 163: 157). DEC-205 tiene diez dominios de lectinas de tipo C contiguos, externos a la membrana (misma referencia; Mahnke *et al.* (2000) *J. Cell Biol.* 151: 673) que median en el procesamiento eficaz y la presentación de antígenos en productos de MHC de clase II *in vivo* (Hawiger *et al.* (2001) *J. Exp. Med.* 194: 769). Se ha mostrado que cantidades pequeñas de antígeno inyectado, dirigidas a DC por la vía adsorbente de DEC-205, son capaces de inducir tolerancia de linfocitos T CD8⁺ periféricos sólida (Bonifaz *et al.* (2002) *J. Exp. Med.* 196(12): 1627).

20

25

30

A pesar de avances recientes en la caracterización de las células dendríticas, se sabe muy poco con respecto a receptores específicos de células dendríticas, tales como DEC-205, y están disponibles pocos reactivos que sean específicos de células dendríticas. Los reactivos, en particular anticuerpos, que reaccionan específicamente o preferentemente con células dendríticas, tal como mediante DEC-205, tienen gran potencial como agentes de dirección para inducir respuestas inmunitarias potentes a antígenos de enfermedad infecciosa o tumoral. Estos agentes de dirección específica a células también podrían modificarse por ingeniería genética para suministrar toxinas para eliminar células presentadoras de antígenos potentes (por ejemplo, células dendríticas) en médula ósea y trasplantes de órganos u otros trastornos autoinmunitarios. En consecuencia, dichos agentes de unión específicos de células dendríticas poseen gran valor terapéutico y diagnóstico.

35

40 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une con el receptor 205 de Células Dendríticas y Epiteliales humanas (DEC-205) y comprende: una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 29; una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°:30; una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 31; una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 35; una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 36; y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 37. La presente invención también proporciona conjugados de vacunas, moléculas biespecíficas y composiciones terapéuticas que contienen dichos anticuerpos. En consecuencia, los anticuerpos y composiciones de la invención pueden usarse en una diversidad de terapias dirigidas a células dendríticas, por ejemplo, para potenciar la presentación de antígenos y/o inducir respuestas de linfocitos T, tales como respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL), contra una diversidad de células o patógenos diana o para tratar enfermedades mediadas por células presentadoras de antígenos (APC).

50

En una realización, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales humanos que se unen con DEC-205 humano con una constante de afinidad de al menos 10^8 M^{-1} como se mide por resonancia de plasmón superficial y opcionalmente muestran al menos una de las siguientes propiedades: (a) internalización después de unión con células dendríticas humanas que expresan DEC-205; (b) generación o potenciación de respuestas de linfocitos T humanos a un antígeno (que puede estar unido al anticuerpo), mediado adecuadamente por rutas del MHC de Clase I y/o Clase II; (c) generación o potenciación de respuestas de CTL o NKT humanos a un antígeno; (d) localización en compartimentos de procesamiento de antígenos en células dendríticas; y (e) inducción de la tolerancia a linfocitos T CD8⁺ periférica; o (f) unión con un anticuerpo localizado en el dominio extracelular de DEC-205 humano, por ejemplo, en uno o una combinación del dominio rico en cisteína, el dominio FcII o uno o más de los diez dominios de tipo lectinas de tipo C. Además, los anticuerpos pueden reaccionar de forma cruzada con DEC-205 en células dendríticas de primate no humano o las de otras especies.

60

65

En una realización adicional, los anticuerpos aislados de la invención se unen con DEC-205 humano e incluyen una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera incluyendo las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 28 y 34, respectivamente.

- 5 También se incluyen en la presente invención anticuerpos aislados que incluyen regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% o más identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias anteriores. También se pretende que estén abarcados por la presente invención intervalos intermedios a los valores anteriormente enumerados, por ejemplo, regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen al menos 80-85%,
10 85-90%, 90-95% o 95-100% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias anteriores.

El anticuerpo aislado puede incluir una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28, o secuencias en las que al menos un resto de aminoácido en la región marco conservada de la región variable de cadena pesada está sustituido con el resto de línea germinal correspondiente. El anticuerpo puede incluir además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 34, o secuencias en las que al menos un resto de aminoácido en la región marco conservada de la región variable de cadena ligera se sustituye con el resto de línea germinal correspondiente. El resto de aminoácido sustituido puede incluir: un resto que se une de forma no covalente directamente con el antígeno; un resto adyacente a una CDR; un resto que interacciona con CDR; un resto que participa en la interfaz VL-VH, un resto canónico, un resto de zona de vernier o un resto de empaquetamiento intercatenario.

Los anticuerpos de la invención pueden ser de longitud completa, por ejemplo, cualquiera de los siguientes isotipos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos tales como una parte de unión a antígeno o un anticuerpo monocatenario (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv, Fv de cadena sencilla, una región determinante de complementariedad aislada (CDR) o una combinación de dos o más CDR aisladas).

La invención también proporciona un conjugado molecular que comprende un anticuerpo de la invención unido a un antígeno (incluyendo fragmentos, epítomos y determinantes antigénicos), tal como componente de un patógeno, un antígeno tumoral o un autoantígeno. Por ejemplo, el antígeno puede incluir un antígeno tumoral, tal como βhCG, gp100 o Pmel17, CEA, gp100, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiotipo, Tirosinasa, Telomerasa, SSX2, MUC-1, MAGE-A3, y antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) MART1, melan-A, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, WT1, Her2, mesotelina o antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA).

La expresión "antígeno tumoral" como se usa en el presente documento preferentemente significa cualquier antígeno o determinante antigénico que esté presente en (o asociado con) una célula tumoral y no típicamente en células normales, o un antígeno determinante antigénico que está presente en o asociado con células tumorales en mayores cantidades que en células normales (no tumorales), o un antígeno o determinante antigénico que está presente en células tumorales en una forma diferente de la que se encuentra en células normales (no tumorales). La expresión incluye por lo tanto antígenos específicos de tumor incluyendo antígenos de membrana específicos de tumor, antígenos asociados a tumor, incluyendo antígenos de membrana asociados a tumor, antígenos embrionarios en tumores, receptores del factor de crecimiento, ligandos del factor de crecimiento, y cualquier otro tipo de antígeno que esté asociado con cáncer. Un antígeno tumoral puede ser, por ejemplo, un antígeno de cáncer epitelial (por ejemplo, de mama, gastrointestinal, de pulmón), un antígeno de cáncer específico de próstata (PSA) o antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), un antígeno de cáncer de vejiga, un antígeno de cáncer de pulmón (por ejemplo, de células pequeñas de pulmón), un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer ovárico, un antígeno de cáncer cerebral, un antígeno de cáncer gástrico, un antígeno de carcinoma de células renales, un antígeno de cáncer pancreático, un antígeno de cáncer de hígado, un antígeno de cáncer esofágico, un antígeno de cáncer de cabeza y cuello o un antígeno de cáncer colorrectal.

El término "fragmento" se refiere a una secuencia de aminoácidos que es una parte de una proteína o polipéptido de longitud completa, por ejemplo entre aproximadamente 8 y aproximadamente 1500 aminoácidos de longitud, convenientemente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 745 aminoácidos de longitud, convenientemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 300, por ejemplo de aproximadamente 8 a aproximadamente 200 aminoácidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 o 100 aminoácidos de longitud.

En otra realización, el complejo molecular incluye además un agente terapéutico, tal como un agente citotóxico, un agente inmunosupresor o un agente quimioterapéutico.

La invención también proporciona una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo de la invención unido con un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente de dicho anticuerpo.

También se proporcionan composiciones que incluyen un anticuerpo, un conjugado molecular o una molécula biespecífica descrita en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente eficaz. Las composiciones pueden incluir además un agente terapéutico (por ejemplo, un agente inmunosupresor o un anticuerpo diferente de un

anticuerpo de la invención).

También están abarcadas por la invención moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención, así como vectores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos y células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión. Además, la invención proporciona un ratón transgénico que comprende transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana, en los que el ratón expresa un anticuerpo de la invención, así como hibridomas preparados a partir de dicho ratón, en el que el hibridoma produce el anticuerpo de la invención.

Los anticuerpos de la presente invención son útiles en métodos para dirigir un antígeno a una célula, por ejemplo, una célula capaz de presentación de antígenos (tal como células mononucleares de sangre periférica (PBMC), monocitos (tales como THP-1), células linfoblastoides B (tales como C1R.A2, 1518 B-LCL) y DC derivadas de monocitos en un sujeto administrando una molécula que se une con un receptor en la célula (por ejemplo, los anticuerpos de DEC-205 descritos anteriormente) unida a un antígeno. La célula diana (que puede ser un linfocito B) puede estimular linfocitos T restringidos del MHC de clase I.

Los anticuerpos y otras composiciones de la presente invención también pueden usarse para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T) contra un antígeno en un sujeto. En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona un método para inducir o potenciar una respuesta de CTL contra un antígeno formando un conjugado del antígeno y un anticuerpo que se une con un receptor en una célula presentadora de antígeno, por ejemplo, DEC-205 humano. El conjugado se pone en contacto después, bien *in vivo* o bien *ex vivo*, con células que expresan DEC-205 humano de modo que el antígeno se internaliza, se procesa y se presenta a linfocitos T de una manera que induce o potencia una respuesta de CTL (por ejemplo, una respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos CD8⁺) contra el antígeno. En otra realización, esto también sirve para inducir una respuesta de linfocitos T auxiliares (por ejemplo, una respuesta mediada por linfocitos T auxiliares CD4⁺) contra el antígeno. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria puede inducirse mediante rutas tanto del MHC de clase I como del MHC de clase II. Las células que expresan DEC-205 también pueden ponerse en contacto con un adyuvante, una citocina que estimula la proliferación de células dendríticas y/o un agente inmunoestimulador para potenciar adicionalmente la respuesta inmunitaria.

En otra realización, se proporcionan métodos para detectar la presencia de DEC-205, o una célula que expresa DEC-205, en una muestra: (a) poniendo en contacto la muestra con el anticuerpo de la invención en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y DEC-205; y (b) detectando la formación de un complejo entre el anticuerpo y DEC-205 en la muestra.

También están dentro del alcance de la invención kits que comprenden las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, conjugados moleculares, moléculas multispecíficas y biespecíficas) de la invención y, opcionalmente, instrucciones para su uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, tal como una citocina o complemento, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une con un epítipo en células dendríticas distintas del primer anticuerpo humano).

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

45 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1I incluyen gráficas que muestran la unión de anticuerpos anti DEC-205 humanos (3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5D12-5G1, 1G6-1G6 y 3A4-1C10) con células CHO-S que expresan DEC-205 por análisis de fluorescencia usando un instrumento LSR™ (BD Biosciences, NJ, Estados Unidos).

Las Figuras 2A-2I incluyen gráficas que muestran la unión de anticuerpos anti DEC-205 humanos (3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5D12-5G1, 1G6-1G6 y 3A4-1C10) con DEC-205 en células dendríticas humanas por citometría de flujo.

La Figura 3 es una gráfica que muestra la unión de anticuerpos anti DEC-205 humanos (3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5D12-5G1, 1G6-1G6 y 3A4-1C10) con DEC-205 usando ELISA.

Las Figuras 4A-4C muestran internalización en las células dendríticas de HuMab marcado con FITC (FITC-3G9-2D2) en comparación con el control (IgG1 human-FITC) usando microscopia confocal.

La Figura 5 es un alineamiento de secuencias de línea germinal VH y VK humanas con secuencias VH y VK de anticuerpos anti DEC-205 (3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5C3-2-3F6, 1E6-3D10). La Figura desvela las SEC ID N° 92, 34, 46, 58, 93, 82, 22, 94, 10, 95, 4, 16, 103-105, 76, 88, 96, 106 y 70, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 6 muestra alineamientos de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 VH de anticuerpos anti DEC-205 humanos (3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 3C7-3A3, 2D3-1F5-2A9, 1E6-3D10, 5C3-2-3F6, 5D12-5G1).

5 La Figura 7 muestra alineamientos de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 VK de HuMab anti DEC-205 humano de anticuerpos anti DEC-205 humanos (3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 3C7-3A3, 5C3-2-3F6).

La Figura 8 muestra una representación esquemática de un ejemplo de una construcción de vacuna dirigida a APC de fusión de antígeno/anti DEC-205.

10 Las Figuras 9A y B incluyen gráficas que muestran la actividad específica de antígeno usando conjugado de vacuna dirigida a APC β hCG-3G9 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), monocitos (THP-1), células linfoblastoides B (C1R.A2, 1518 B-LCL) y DC derivadas de monocitos.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención proporciona anticuerpos (por ejemplo anticuerpos humanos) que se unen con DEC-205 humano. En ciertas realizaciones los anticuerpos muestran una diversidad de propiedades funcionales, por ejemplo, unión con DEC-205 humano con una constante de afinidad de al menos 10^8 M^{-1} como se mide por resonancia de plasmón superficial, internalización después de unión con células dendríticas humanas que expresan DEC-205, generación o potenciación de respuestas de linfocitos T humanos, por ejemplo respuestas de linfocitos CD4^+ o CD8^+ (CTL) o NKT, a un antígeno que puede unirse al anticuerpo, por ejemplo, respuestas de CTL mediadas por rutas del MHC tanto de Clase I como de Clase II; localización en compartimentos de procesamiento de antígenos en células dendríticas; inducción de tolerancia a linfocitos T CD8^+ periféricos; o reacción cruzada con DEC-205 en células dendríticas de primate no humanas o las de otras especies. En otras realizaciones, los anticuerpos incluyen regiones variables de cadena pesada y ligera que utilizan genes de línea germinal humanos particulares e incluyen elementos estructurales particulares tales como secuencias de CDR particulares. La invención proporciona además métodos para preparar dichos anticuerpos, conjugados moleculares y moléculas biespecíficas que incluyen dichos anticuerpos, así como composiciones que contienen los anticuerpos. La invención también proporciona métodos para dirigir antígenos a células presentadoras de antígenos (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), monocitos (tales como THP-1), células linfoblastoides B (tales como C1R.A2, 1518 B-LCL) y DC derivadas de monocitos bien *in vitro* o bien *in vivo*, por ejemplo, usando los anticuerpos anti DEC-205 de la presente invención. Los métodos de la presente invención también incluyen métodos para inducir y potenciar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T) contra un antígeno en un sujeto. Dichos métodos incluyen la presentación del antígeno mediante un receptor en una célula presentadora de antígenos (por ejemplo, DEC-205) como un componente de un conjugado de MHC-I y/o MHC-II (por ejemplo, la respuesta de linfocitos T está mediada por linfocitos T tanto CD4^+ como CD8^+ o por linfocitos T citotóxicos o linfocitos T auxiliares). En una realización la célula diana (que puede ser un linfocito B) estimula linfocitos T restringidos por MHC de Clase I.

40 Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen en prime lugar ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

45 La expresión "receptor 205 de Células Dendríticas y Epiteliales humanas" (DEC-205) incluye cualquier variante o isoforma de DEC-205 que se exprese de forma natural por células (por ejemplo, DEC-205 humano depositado en GENBANK[®] que tiene el n° de referencia AAC17636, y DEC-205 de ratón depositado en GENBANK[®] que tiene el número de referencia AAL81722). En consecuencia, los anticuerpos de la invención pueden reaccionar de forma cruzada con DEC-205 de especies distintas del ser humano. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser específicos de DEC-205 humano y pueden no mostrar ninguna reactividad cruzada con otras especies. DEC-205 o cualquier variante e isoforma del mismo, puede aislarse de células o tejidos que lo expresan de forma natural (por ejemplo, células humanas, de ratón y de mono cynomolgus) o puede producirse de forma recombinante usando técnicas bien conocidas en este campo y/o las descritas en el presente documento.

50 Genbank[®] (N° de Referencia AAC17636A) indica la secuencia de aminoácidos de DEC-205 humano como sigue (SEC ID N°: 1):

55

```

1      mrtgwatpr pagllmlfw ffdlaepsgr aandpftivh gntgkcikpv ygwivaddcd
61     etedklwkvw sqhrffhlhs qkclglditk svnelrmfsc dssamlwwkc ehhslygaar
121    yrlalkdghg taisnasdvw kkggseeelc dqpyheiyr dgnsygrpce pflidgtwh
181    hdcildedhs gpwcattlly eydrkwgicl kpengcednw ekneqfgscy qfntqtalsw
241    keayvscqnq gadllsinsa aeltylkeke giakifwigl nqlysargwe wsdhkpnlfl
301    nwdpdpsap tiggsscarm daesglwqsf scaaqlpyvc rkplnntvel tdvwtysdtr
361    cdagwlpnng fcyllvnesn swdkahakck afssdlisih sladvevvvt klnhedikee
421    vwiglknini ptfqwsdgt evltiywden epnvpynktp ncvsylgelg qkwvqsceek
481    lkyvckrkge kindassdkm cppdegwkrh getcykiyed evpfgtncnl titsrfeqey
541    lndlmkkydk slrkyfwtgl rdvdscgeyn watvggrna vtfsnwnfle paspggcvam
601    stgksvkgwe vkdcrsfkal sickkmsgpl gpeeaspkpd dpcpegwqsf paslsckvfv
    
```

661 hlaerivrkn weeaerfcqa lgahlssfsh vdeikeflhf ltdqfsgqhw lwiglnkrsp
 721 dlqgswqwsd rtpvstiimp nefqqdydir dcaavkvfhr pwirgwhfyd drefiylrpf
 781 acdtklewvc qipkgrtpkt pdwynpdrag ihgppliieg seywfvadlh lnyeeavlyc
 841 asnhslati tsfvglkai nkianisgdg qkwwirisew piddhftysr ypwhrfpvtf
 901 geeclmysak twlidlgkpt dcstklpfc ekynvsslek yspdsaakvq cseqwipfqh
 961 kcfllkikpvs ltfqsqsdtc hsyggtlpsv lsqieqdfit slldmeatl wiglrwtaye
 1021 kinkwtdnre ltyfnfpll vsgrlripen ffeesryhc ailnlqksp figtwnftsc
 1081 serhfvslcq kysevksrqt lqnasetvky lnnlykiipk tlwhtsakre clksnmqlvs
 1141 itdpyqqafll svqallhnss lwiglfsqdd elnfgwsdgg rlfhsrwaet ngqledcvvl
 1201 dtdgfwktvd cndnqpgaic yysgneteke vkpvdsvkcp spvlntpwip fqncynfii
 1261 tknrhmattq devhtkcqkl npkshlsir dekennfvle qllyfnymas wvmigityrn
 1321 nslmwfdkpt lsythwragr ptiknefla glstdgfwdi qtfkvieeav yfhqhsilac
 1381 kiemvdykee hnttlpqfmp yedgiysviq kkvtyealn mcsqsgghla svhnqngqlf
 1441 ledivkrdfg plwvglsshd gsessfewsd gsfdyipwk gqtspgncvl ldpkgtwkhe
 1501 kcnsvkdgai cykptkskkl srlyssrcp aakengsrwi qykghcyksd qalhsfseak
 1561 klcskhdsaa tivsikdede nkfvslmre nnnitmrwl glsqhsvdqs wswldgsevt
 1621 fvkwenksks gvgrcsmlia snetwkkvec ehgfgvrvc vplgpdtyai aiivatlsil
 1681 vlmggliwfl fqrhrhlag fssvryaqqv nedeimlpsf hd

Los dominios principales de DEC-205 humano pueden representarse de la siguiente manera:

N-CR-FNII-CTLD1-CTLD2-CTLD3-CTLD4-CTLD5-CTLD6-CTLD7-CTLD8-CTLD9-CTLD10-TMC

- 5 Donde N es el extremo N terminal, CR representa el dominio “Rico en Cys”, FNII representa el dominio de “Fibronectina de Tipo II”, CTLD1 a CTLD10 representan los diez dominios “de tipo Lectina de Tipo C” y TMC representa los dominios transmembrana y citoplasmático.
- 10 La expresión “célula dendrítica” como se usa en el presente documento, incluye células dendríticas inmaduras y maduras y células progenitoras mieloides relacionadas que son capaces de diferenciarse en células dendríticas, o células presentadoras de antígeno relacionadas (por ejemplo, monocitos y macrófagos) porque expresan antígenos en común con células dendríticas. Como se usa en el presente documento, el término “relacionado” incluye una célula que deriva de una célula o linaje celular progenitor común. En una realización, la unión de un anticuerpo de la invención con células dendríticas media en un efecto en el crecimiento y/o función de células dendríticas dirigiendo moléculas o células con funciones definidas (por ejemplo, células tumorales, células efectoras, patógenos microbianos) a células dendríticas. En una realización adicional, la unión de un anticuerpo de la invención con una célula dendrítica da como resultado la internalización del anticuerpo por la célula dendrítica.
- 15 20 Las “moléculas del MHC” incluyen dos tipos de moléculas, MHC de clase I y MHC de clase II. Las moléculas del MHC de clase I presentan antígeno a linfocitos T CD8⁺ específicos y las moléculas del MHC de clase II presentan antígeno a linfocitos T CD4⁺ específicos. Los antígenos suministrados de forma exógena a APC se procesan principalmente para asociación con MHC de clase II. Por el contrario, los antígenos suministrados de forma endógena a APC se procesan principalmente para asociación con MHC de clase I. Sin embargo, en condiciones específicas, las DC tienen la capacidad única de permitir que antígenos exógenos accedan a compartimentos internos para unión con moléculas del MHC de clase I, además de moléculas del MHC de clase II. Este proceso se llama “sensibilización cruzada” o “presentación cruzada”.
- 25 30 Como se usa en el presente documento, la expresión “agente inmunoestimulador” se refiere a compuestos capaces de estimular APC, tales como DC y macrófagos. Por ejemplo, los agentes inmunoestimuladores adecuados para su uso en la presente invención son capaces de estimular APC de modo que se acelere el proceso de maduración de las APC, aumente la proliferación de las APC, y/o se regule positivamente el reclutamiento o liberación de moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD80, CD86, ICAM-1, moléculas del MHC y moléculas CCR7) y citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15 e IFN- γ). Los agentes inmunoestimuladores adecuados también son capaces de aumentar la proliferación de linfocitos T. Dichos agentes inmunoestimuladores incluyen, pero sin limitación, ligando CD40; citocinas, tales como IFN- α , IFN- β , IFN- γ e IL-2; factores estimulantes de colonias, tales como G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) y GM-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos); un anticuerpo anti CTLA-4; LPS (endotoxina); ARNm; ARNc; Bacilo de Calmette-Guerin (BCG); clorhidrato de Levamisol; e inmunoglobulinas intravenosas. En una realización, un agente inmunoestimulador puede ser un agonista de Receptor de tipo Toll (TLR). Por ejemplo, el agente inmunoestimulador puede ser un agonista de TLR3 tal como un polinucleótido bicatenario de inosina:citosina (Poli I:C, por ejemplo disponible como AmpligenTM de Hemispherx Bipharma, PA, Estados Unidos) o Poli A:U; un agonista de TLR4 tal como monofosforil lípido A (MPL) o RC-529 (por ejemplo como está disponible de GSK, Reino Unido); un agonista de TLR5 tal como flagelina; un agonista de TLR7 o TLR8 tal como un agonista de TLR7 o TLR 8 de imidazoquinolina, por ejemplo imiquimod (por ejemplo AldaraTM) o resiquimod y agentes de imidazoquinolina relacionados (por ejemplo como está disponible de 3M Corporation); o un agonista de TLR 9 tal como un desoxinucleótido con motivos de CpG no metilados (denominados “CpG”, por ejemplo, como está disponible de Coley Pharmaceutical). Dichos agentes inmunoestimuladores pueden administrarse de forma simultánea, por
- 35 40 45

separado o secuencialmente con los anticuerpos y construcciones de la presente invención y también pueden unirse físicamente con los anticuerpos y construcciones.

5 Como se usa en el presente documento, el término “unido” se refiere a la asociación de dos o más moléculas. El enlace puede ser covalente o no covalente. El enlace también puede ser genético (es decir, fusionado de forma recombinante). Dichos enlaces pueden conseguirse usando una amplia diversidad de técnicas reconocidas en este campo, tales como conjugación química y producción de proteínas recombinante.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión antígeno “de presentación cruzada” se refiere a la presentación de antígenos de proteína exógena a linfocitos T mediante moléculas del MHC de clase I y clase II en APC.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “respuesta mediada a linfocitos T” se refiere a cualquier respuesta mediada por linfocitos T, incluyendo linfocitos T efectoros (por ejemplo, células CD8⁺) y linfocitos T auxiliares (por ejemplo, células CD4⁺). Las respuestas mediadas por linfocitos T incluyen, por ejemplo, citotoxicidad y proliferación de linfocitos T.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión “respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL)” se refiere a una respuesta inmunitaria inducida por linfocitos T citotóxicos. Las respuestas de CTL están mediadas principalmente por linfocitos T CD8⁺.

25 El término “anticuerpo” como se indica en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, “parte de unión a antígeno”) o cadena sencilla de los mismos. Un “anticuerpo” se refiere, en una realización preferida, a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadena ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de la misma. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L puede subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con tejidos o factores hospedadores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

40 La expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “parte de anticuerpo”), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente con un antígeno (por ejemplo, DEC-205 humano). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente en los dominios V_L, V_H, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd consistente en los dominios V_H y CH1; (iv) un fragmento Fv consistente en los dominios V_L y V_H de una única rama de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios de fragmento Fv, V_L y V_H, se codifican por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que permite que se compongan como una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Se pretende también que dichos anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro de la expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se exploran con respecto a utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Pueden producirse partes de unión a antígeno por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulina intactas.

60 Un “anticuerpo bifuncional” o “biespecífico” es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos por una diversidad de métodos incluyendo fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

65

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. En consecuencia, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo que presenta una única especificidad de unión y que tiene regiones constantes variables y opcionales derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, se producen anticuerpos monoclonales humanos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén en cadena ligera fusionado con una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humana combinatoria, recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes que comprenden regiones variables y constantes que utilizan secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana particulares se codifican por los genes de línea germinal, pero incluyen reordenaciones y mutaciones posteriores que se producen, por ejemplo, durante la maduración del anticuerpo. Como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1117-1125), la región variable contiene el dominio de unión a antígeno, que está codificado por diversos genes que se reordenan para formar un anticuerpo específico para un antígeno ajeno. Además de la reordenación, la región variable puede modificarse adicionalmente por múltiples cambios de aminoácidos individuales (denominados mutación somática o hipermutación) para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno ajeno. La región constante cambiará en respuesta adicional a un antígeno (es decir, cambio de isotipo). Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico reordenadas y mutadas de forma somática que codifican los polipéptidos de inmunoglobulina de cadena ligera y cadena pesada en respuesta a un antígeno pueden no tener identidad de secuencia con las moléculas de ácido nucleico originales, pero en su lugar serán sustancialmente idénticas o similares (es decir, tienen al menos 80% de identidad).

La expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica *in vitro* o por mutación somática *in vivo*) (véase, Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764: 536-546). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco conservadas humanas (es decir, anticuerpos humanizados).

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con el organismo no humano transgénico que produce dicho anticuerpo. Esta expresión se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la hallada en un organismo no consistente en el animal no humano transgénico, y generalmente de una especie distinta de la del animal no humano transgénico.

Se entiende que un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente sin otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a antígenos distintos del DEC-205 humano esta sustancialmente sin anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del DEC-205 humano). Un anticuerpo aislado que se une específicamente con un epítipo puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otras proteínas DEC-205 de especies diferentes. Sin embargo, el anticuerpo preferentemente se une siempre a DEC-205 humano. Además, un anticuerpo aislado está típicamente sustancialmente sin otro material celular y/o productos químicos. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos "aislados" que tienen diferentes especificidades de DEC-205 se combina en una composición bien definida.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o un anticuerpo. Pueden formarse epítopos a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados de aminoácidos contiguos típicamente se conservan en exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen técnicas en este campo y los descritos en el presente documento, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional (véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). En el presente caso, un epítipo se localiza preferentemente en el dominio extracelular de

DEC-205 humano, por ejemplo en uno o una combinación del dominio rico en cisteína, el dominio de FnII o uno o más de los diez dominios de tipo lectinas de tipo C de DEC-205 humano.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “unión específica”, “unión selectiva”, “se une selectivamente” y “se une específicamente”, se refieren a un anticuerpo que se une con un epítipo en un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor cuando se determina por tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE 2000 usando DEC-205 humano como el analito y el anticuerpo como el ligando y se une con el antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión con un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de forma intercambiable en el presente documento con la expresión “un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno”.

También están abarcados por la presente invención anticuerpos que se unen con el mismo epítipo y/o anticuerpos que compiten por la unión con DEC-205 humano con los anticuerpos descritos en el presente documento. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo o compiten por la unión pueden identificarse usando técnicas rutinarias. Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo, que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de un anticuerpo con un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina que se ensaya inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común, tal como DEC-205. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo de fase sólida directo o indirecto (RIA), inmunoensayo enzimático de fase sólida directo o indirecto (EIA), ensayo de competición de tipo sándwich (véase Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9: 242 (1983)); EIA de biotina-avidina de fase sólida directo (véase Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137: 3614 (1986)); ensayo marcado directo de fase sólida, ensayo de tipo sándwich marcado directo de fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcador directo de fase sólida usando marcador 1-125 (véase Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1): 7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); y RIA marcado directo. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32: 77 (1990)). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido con una superficie sólida o células que portan uno de estos, una inmunoglobulina de ensayo no marcado y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido con la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Habitualmente la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Habitualmente, cuando está presente un anticuerpo competidor en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común en al menos 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75 % o más.

Otras técnicas incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítopos, tales como análisis de rayos x de cristales de antígeno; complejos de anticuerpo que proporcionan resolución atómica del epítipo. Otros métodos controlan la unión del anticuerpo con fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno donde la pérdida de unión debida a una modificación de un resto de aminoácido dentro de la secuencia antigénica se considera con frecuencia un indicio de un componente epitópico. Además, también pueden usarse métodos combinatorios informáticos para mapeo de epítopos. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos de bibliotecas peptídicas de presentación de fagos combinatorias. Los péptidos se consideran por lo tanto candidatos para la definición del epítipo correspondiente al anticuerpo usado para explorar la biblioteca peptídica. Para mapeo de epítopos, también se han desarrollado algoritmos informáticos que se ha mostrado que mapean epítopos discontinuos conformacionales.

Se pretende que el término “ K_D ”, como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Típicamente, los anticuerpos humanos de la invención se unen con DEC-205 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como menos de 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor cuando se determina por tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE 2000 usando DEC-205 humano recombinante como el analito y el anticuerpo como el ligando.

Se pretende que el término “ k_d ” como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

Se pretende que el término “ k_a ” como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de velocidad de asociación para la asociación de un anticuerpo con el antígeno.

El término “CE50”, como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración de un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo, que induce una respuesta, bien en un ensayo *in vitro* o uno *in vivo*, que es el 50% de la respuesta máxima, es decir, la mitad entre la respuesta máxima y la línea basal.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que se codifica por genes de la región constante de cadena pesada. En una realización, un anticuerpo monoclonal humano de la invención es del isotipo IgG1. En otra realización, un anticuerpo monoclonal humano de la invención es del isotipo IgG2.

5 La expresión "se une con DEC-205 inmovilizado", se refiere a la capacidad de un anticuerpo humano de la invención para unirse con DEC-205, por ejemplo, expresado en la superficie de una célula o que se une con un soporte sólido.

10 La expresión "reacciona de forma cruzada", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo de la invención para unirse con DEC-205 de una especie diferente. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que se une con DEC-205 humano puede también unirse con DEC-205 de cynomolgus. Como se usa en el presente documento, la reactividad cruzada se mide detectando una reactividad específica con antígeno purificado en ensayos de unión (por ejemplo, SPR, ELISA) o unión con, o interacción funcional de otro modo con, células que expresan fisiológicamente DEC-205. Los métodos para determinar la reactividad cruzada incluyen ensayos de unión convencionales como se describen en el presente documento, por ejemplo, por análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore™ usando un instrumento SPR Biacore™ 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) o unión con células que expresan DEC-205 de la especie de interés (por ejemplo, células dendríticas), por ejemplo, mediante técnicas citométricas de flujo.

20 Como se usa en el presente documento, "cambio de isotipo" se refiere al fenómeno por el que la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

25 Como se usa en el presente documento, "isotipo no cambiado" se refiere a la clase isotípica de cadena pesada que se produce cuando no ha tenido lugar cambio de isotipo; el gen CH que codifica el isotipo no cambiado es típicamente el primer gen CH inmediatamente cadena abajo del gen VDJ reordenado funcionalmente. El cambio de isotipo se ha clasificado como cambio de isotipo clásico o no clásico. El cambio de isotipo clásico se produce por acontecimientos de recombinación que implican al menos una región de secuencia de cambio en el transgén. El cambio de isotipo no clásico puede producirse, por ejemplo, mediante recombinación homóloga entre σ_{μ} , humano y Σ_{μ} , (delección asociada a δ). Pueden producirse mecanismos de cambio no clásico alternativos, tales como recombinación intertransgén y/o intercromosómica, entre otras, y efectuar cambios de isotipo.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de cambio" se refiere a las secuencias de ADN responsables de la recombinación de cambio. Una secuencia "donante de cambio", típicamente una región de cambio μ , estará 5' (es decir, cadena arriba) de la región de construcción para suprimir durante la recombinación de cambio. La región "aceptora de cambio" estará entre la región de construcción para suprimir y la región constante de reemplazo (por ejemplo, γ , ϵ , etc.). Como no hay sitio específico donde se produzca recombinación siempre, la secuencia génica final típicamente no será predecible a partir de la construcción.

35 Como se usa en el presente documento, el "patrón de glicosilación" se define como el patrón de unidades de carbohidratos que están unidas covalentemente con una proteína, más específicamente con una proteína de inmunoglobulina. Un patrón de glicosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse como sustancialmente similar a patrones de glicosilación que aparecen de forma natural en anticuerpos producidos por la especie del animal transgénico no humano, cuando un experto en la materia reconocería el patrón de glicosilación del anticuerpo heterólogo como más similar a dicho patrón de glicosilación en la especie del animal transgénico no humano que a la especie de la que derivaron los genes CH del transgén.

40 La expresión "de origen natural" como se usa en el presente documento aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

45 El término "reordenado" como se usa en el presente documento, se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera donde un segmento V está posicionado inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio V_H o V_L completo, respectivamente. Un locus génico de inmunoglobulina reordenado puede identificarse por comparación con ADN de línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología de nonámero/heptámero recombinado.

50 La expresión "no reordenado" o "configuración de línea germinal" como se usa en el presente documento en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no está recombinado para ser inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

55 Se entiende que la expresión "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, incluye moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

65

La expresión “molécula de ácido nucleico aislada”, como se usa en el presente documento en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de anticuerpo (por ejemplo, V_H, V_L, CDR3) que se unen con DEC-205, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o parte del anticuerpo están sin otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o partes de anticuerpo que se unen a antígenos distintos de DEC-205, pudiendo dichas otras secuencias flanquear de forma natural el ácido nucleico en ADN genómico humano. Por ejemplo, las SEC ID N°: 2, 3 (con péptido señal) / 4 (sin péptido señal), y SEC ID N°: 8, 9 (con péptido señal) / 10 (sin péptido señal) corresponden, respectivamente, a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que comprenden las regiones variables de cadena pesada (V_H) y cadena ligera (V_L) del anticuerpo anti-DEC-205 humano 3D6-2F4 de la invención. En particular, la SEC ID N°: 2 y 3/4 corresponden a la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de V_H del anticuerpo 3D6-2F4, SEC ID N°: 8 y 9/10 corresponden a la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de V_L del anticuerpo 3D6-2F4.

Las “modificaciones de secuencia conservativa” de las secuencias expuestas en SEC ID N°: 2-91 son modificaciones de secuencia de nucleótidos y aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos, con el antígeno. Dichas modificaciones de secuencia conservativas incluyen sustituciones de nucleótidos y aminoácidos conservativas, así como adiciones y deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, pueden introducirse modificaciones en las SEC ID N°: 2-91 por técnicas convencionales conocidas en este campo, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen algunas en las que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti DEC-205 humano se reemplaza preferentemente con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Se conocen bien en la técnica métodos para identificar sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno (véase, por ejemplo, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999); y Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)).

Como alternativa, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti DEC-205, tal como por mutagénesis de saturación y los anticuerpos anti DEC-205 modificados resultantes pueden explorarse con respecto a actividad de unión.

Para ácidos nucleicos, la expresión “homología sustancial” indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y se comparan de forma óptima, son idénticos, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80% de los nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 90% a 95%, y más preferentemente al menos aproximadamente 98% a 99,5% de los nucleótidos. Como alternativa, existe homología sustancial cuando los segmentos hibriden en condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la cadena.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = N° de posiciones idénticas/N° total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes posteriores.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48): 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

La secuencia de ácido nucleico y proteína de la presente invención pueden usarse adicionalmente como una “secuencia de consulta” para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos de BLAST con

el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Pueden realizarse búsquedas de proteínas de BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas de las moléculas proteicas de la invención. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, puede utilizarse BLAST con huecos como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y BLAST con Huecos, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.nc-bi.nlm.nih.gov>.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o se "hace sustancialmente puro" cuando se purifica de los otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otras proteínas o ácidos nucleicos celulares, por técnicas convencionales, incluyendo tratamiento con SDS/alcalino, formación de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en este campo. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque están con frecuencia en una secuencia nativa (excepto para sitios de restricción modificados y similares) de ADNc, genómico o mezclas de los mismos, pueden mutarse, de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas de o derivadas de secuencias nativas V, D, J, constantes, de cambio y otras descritas en el presente documento (donde "derivado" indica que una secuencia es idéntica o modificada de otra secuencia).

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a secuencias reguladoras de la transcripción, unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en fase de lectura. Para secuencias de cambio, unido operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar recombinación de cambio.

Se pretende que el término "vector", como se usa en el presente documento, se refiera a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector más habitualmente usada. Sin embargo, se pretende que la invención incluya otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos en replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

Se pretende que la expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa en el presente documento, se refiera a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debería entenderse que se pretende que dichos términos se refieran no solamente a la célula objeto particular sino a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún está incluida dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" como se usa en el presente documento.

La expresión "célula presentadora de antígenos" o "APC" es una célula que presenta antígeno ajeno en complejo con MHC en su superficie. Los linfocitos T reconocen este complejo usando el receptor de linfocitos T (TCR). Los ejemplos de APC incluyen, pero sin limitación, células dendríticas (DC), células mononucleares de sangre periférica (PBMB), monocitos (tales como THP-1), células linfoblastoides B (tales como C1R.A2, 1518 B-LCL) y células dendríticas (DC) derivadas de monocitos. Algunas APC internalizan antígenos por fagocitosis o por endocitosis mediada por receptor. Los ejemplos de receptores de APC incluyen, pero sin limitación, lectinas de tipo C, tales como el receptor 205 de Células Dendríticas y Epiteliales (DEC-205) humano y el receptor de manosa de macrófagos humano.

La expresión “presentación de antígenos” se refiere al proceso por el que las APC capturan antígenos y permiten su reconocimiento por linfocitos T, por ejemplo, como un componente de un conjugado de MHC-1 y/o MHC-II.

Las expresiones “inducir una respuesta inmunitaria” y “potenciar una respuesta inmunitaria” se usan de forma intercambiable y se refieren a la estimulación de una respuesta inmunitaria (es decir, pasiva o adaptativa) a un antígeno particular.

Los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento”, como se usan en el presente documento, se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en el presente documento. Los métodos de “tratamiento” emplean administración a un sujeto, que necesite dicho tratamiento, de un anticuerpo humano de la presente invención, por ejemplo, un sujeto que necesite una respuesta inmunitaria potenciada contra un antígeno particular o un sujeto que en última instancia pueda adquirir dicho trastorno, para prevenir, curar, retardar, reducir la gravedad de o aliviar uno o más síntomas del trastorno o trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de la esperada en ausencia de dicho tratamiento.

La expresión “dosis eficaz” o “dosificación eficaz” se define como una cantidad suficiente para conseguir o al menos conseguir parcialmente el efecto deseado. La expresión “dosis terapéuticamente eficaz” se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad del trastorno que se trate y el estado general del propio sistema inmunitario del paciente.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar a un sujeto con un trastorno inmunitario. La expresión “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Se describen diversos aspectos de la invención en más detalle en las siguientes subsecciones.

I. Producción de anticuerpos para DEC-205

La presente invención abarca anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, que se unen con DEC-205, por ejemplo, DEC-205 humano. Los anticuerpos monoclonales ejemplares que se unen con DEC-205 incluyen 3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5D12-5G1, 1G6-1G6, 5C3-2-3F6, 1E6-3D10 y 3A4-1C10.

Pueden producirse anticuerpos monoclonales de la invención usando una diversidad de técnicas conocidas, tales como la técnica de hibridación de células somáticas convencional descrita por Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, también pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B, técnica de presentación de fagos usando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos.

En consecuencia, en una realización, se usa un método de hibridoma para producir un anticuerpo que se une con DEC-205 humano. En este método, puede inmunizarse un ratón u otro animal hospedador apropiado con un antígeno adecuado para inducir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente con el antígeno usado para inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos pueden fusionarse después con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vitro* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, líquido ascítico, o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En otra realización, pueden aislarse anticuerpos y partes de anticuerpo que se unan a DEC-205 humano de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991), Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) y Hoet *et al.* (2005) *Nature Biotechnology* 23, 344-348; Patentes de Estados Unidos N° 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner *et al.*; Patentes de Estados Unidos N° 5.427.908 y 5.580.717 de Dower *et al.*; Patentes de Estados Unidos N° 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty *et al.*; y Patentes de Estados Unidos N° 5.885.793;

6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths *et al.* Adicionalmente, también puede usarse producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por redistribución de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)).

En una realización particular, el anticuerpo que se une con DEC-205 humano se produce usando la técnica de presentación de fagos descrita por Hoet *et al.*, mencionado anteriormente. Esta técnica implica la generación de una biblioteca de Fab humano que tiene una combinación única de secuencias de inmunoglobulina aisladas de donantes humanos y que tiene diversidad sintética en las CDR de cadena pesada. La biblioteca se explora después con respecto a Fab que se unen con DEC-205 humano.

El sistema animal preferido para generar hibridomas que producen anticuerpos de la invención es el sistema murino. Se conocen bien en la técnica la producción de hibridomas en el ratón, incluyendo protocolos de inmunización y técnicas para aislar y fusionar esplenocitos inmunizados.

En una realización, se generan anticuerpos dirigidos contra DEC-205 usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. En una realización, la invención emplea ratones transgénicos, denominados en el presente documento "ratones HuMAb" que contienen un minilocus génico de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y pesada (μ y γ) humanas no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena μ y κ endógenos (Lonberg, N. *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859). En consecuencia, los ratones muestran expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), mencionado anteriormente; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764: 536-546). La preparación de ratones HuMAb se describe en detalle en la Sección II posterior y en Taylor, L. *et al.* (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J. *et al.* (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon *et al.* (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; Lonberg *et al.*, (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Taylor, L. *et al.* (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93; Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764: 536-546; Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Véase además, Patentes de Estados Unidos N° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299 y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay, y GenPharm International; Patente de Estados Unidos N° 5.545.807 de Surani *et al.*; Publicaciones Internacionales N° WO 98/24884, publicada el 11 de junio de 1998; WO 94/25585, publicada el 10 de noviembre de 1994; WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; WO 92/22645, publicada el 23 de diciembre de 1992; WO 92/03918, publicada el 19 de marzo de 1992.

Inmunizaciones

Para generar anticuerpos completamente humanos para DEC-205, pueden inmunizarse ratones transgénicos o transcromosómicos que contienen genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones HCo12, HCo7 o KM) con una preparación purificada o enriquecida del antígeno DEC-205 y/o células que expresan DEC-205, como se describe, por ejemplo, en Lonberg *et al.* (1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y el documento WO 98/24884. Como se describe en el presente documento, los ratones HuMAb se inmunizan con proteínas DEC-205 recombinantes o líneas celulares que expresan DEC-205 como inmunógenos. Como alternativa, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica DEC-205 humano. Preferentemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada o enriquecida (5-50 μ g) del antígeno DEC-205 recombinante para inmunizar los ratones HuMAb por vía intraperitoneal. En caso de que las inmunizaciones usando una preparación purificada o enriquecida del antígeno DEC-205 no dé cómo resultado anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresen DEC-205, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias. Las líneas celulares ejemplares incluyen líneas celulares Raji y CHO estables que sobreexpresan DEC-205.

La experiencia acumulada con diversos antígenos ha mostrado que los ratones transgénicos para HuMAb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) o por vía subcutánea (SC) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP/SC cada dos semanas (hasta un total de 10) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmunitaria puede controlarse durante el transcurso del protocolo de inmunización obteniéndose muestras de plasma por extracción de sangre retroorbital. El plasma puede explorarse por ELISA (como se describe posteriormente), y pueden usarse ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti DEC-205 para fusiones. Los ratones pueden potenciarse por vía intravenosa con el antígeno 3 días antes del sacrificio y retirada del bazo.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales para DEC-205

Para generar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales para DEC-205, pueden aislarse esplenocitos y células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden después explorarse con respecto a la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones celulares individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG 50% (p/v). Las células pueden sembrarse a aproximadamente 1×10^5 en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene además de reactivos habituales Suero de Clon fetal 10%, factor de clonación de hibridoma origen 5-10% (IGEN) y HAT 1X (Sigma). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en el que el HT se reemplaza con HAT. Después pueden explorarse pocillos individuales por ELISA con respecto a anticuerpos IgM e IgG monoclonales anti DEC-205 humano, o con respecto a unión con la superficie de células que expresan DEC-205, por ejemplo, una línea celular CHO que expresa DEC-205, por FLISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a fluorescencia). Una vez que se produce crecimiento de hibridoma extensivo, el medio puede observarse habitualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo pueden volver a sembrarse en placas, explorarse de nuevo, y si aún son positivos para IgG, los anticuerpos monoclonales anti DEC-205 pueden subclonarse al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden después cultivarse *in vitro* para generar anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterización.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales para DEC-205

También pueden producirse anticuerpos de la invención en un transfectoma de células hospedadoras usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como se conocen bien en este campo (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, en una realización, el gen o los genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos humanos, pueden ligarse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como el usado por el sistema de expresión génica GS desvelado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonados puede introducirse en células hospedadoras eucariotas tales como células CHO o células NSO o como alternativa otras células eucariotas como células derivadas de plantas, células de hongos o de levadura. El método usado para introducir estos genes podría ser métodos descritos en la técnica tales como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de introducir estos genes de anticuerpo en las células hospedadoras, pueden identificarse y seleccionarse células que expresen el anticuerpo. Estas células representan los transfectomas que pueden después amplificarse con respecto a su nivel de expresión y aumentarse de escala para producir anticuerpos. Pueden aislarse y purificarse anticuerpos recombinantes a partir de estos sobrenadantes de cultivo y/o células.

Como alternativa estos genes de anticuerpo clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión tales como *E. coli* o en organismos completos o pueden expresarse sintéticamente.

Uso de secuencias de anticuerpos parciales para expresar anticuerpos intactos

Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana predominantemente mediante restos de aminoácidos que se localizan en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias CDR del anticuerpo de origen natural específicas injertadas en secuencias marco conservadas de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, 1998, Nature 332: 323-327; Jones, P. *et al.*, 1986, Nature 321: 522-525; y Queen, C. *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033). Dichas secuencias marco conservadas pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpo de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias génicas de anticuerpo maduro debido a que no incluirán genes variables ensamblados completamente, que se forman mediante unión de V(D)J durante la maduración de linfocitos B. Las secuencias génicas de línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad individualmente de forma homogénea a través de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la parte amino terminal de la región marco conservada. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la parte amino terminal de la región marco conservada 1 y en la parte carboxilo terminal de la región marco conservada 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase documento PCT/US99/05535 presentado el 12 de marzo de 1999). Una secuencia de cadena pesada y ligera parcial que abarque las regiones CDR es típicamente suficiente para este fin. La secuencia parcial se usa para determinar

qué segmentos génicos variables y de unión de línea germinal contribuyen a los genes variables de anticuerpo recombinados. La secuencia de línea germinal se usa después para rellenar con partes ausentes de las regiones variables. Las secuencias líderes de cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias ausentes, pueden combinarse

5 secuencias de ADNc clonadas con oligonucleótidos sintéticos por ligación o amplificación por PCR. Como alternativa, la región variable completa puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos, solapantes, y combinarse por amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este procedimiento tiene ciertas ventajas tales como la eliminación o inclusión de sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

10 Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera de un hibridoma se usan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades codificantes de aminoácidos idénticas a las secuencias naturales. Las secuencias de cadena pesada y kappa sintéticas pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: se interrumpen filas de bases nucleotídicas repetidas para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y amplificación por PCR; se incorporan sitios de inicio de la traducción óptimos de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870); y se introducen por ingeniería genética sitios HindIII cadena arriba de los sitios de inicio de la traducción.

20 Para las regiones variables de cadena tanto pesada como ligera, las secuencias de cadena codificante optimizada, y no codificante correspondiente, se descomponen en 30 - 50 nucleótidos, aproximadamente el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos de dobles cadenas solapantes que abarcan segmentos de 150 - 400 nucleótidos. Los grupos se usan después como moldes para producir productos de amplificación por PCR de 150 - 400 nucleótidos. Típicamente, un único conjunto de oligonucleótidos de región variable se descompondrá en dos grupos que se

25 amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos solapantes se combinan después por amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de cadena pesada o ligera (incluyendo el sitio BbsI de la cadena ligera kappa, o el sitio AgeI de la cadena pesada gamma) en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente en las construcciones de vectores de expresión.

30 Después se combinan las regiones variables de cadena pesada y ligera reconstruidas con secuencias de promotor clonado, secuencia líder, inicio de la traducción, secuencia líder, región constante, 3' no traducida, poliadenilación y terminación de la transcripción, para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un único vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado en células hospedadoras que después se fusionan para formar una célula

35 hospedadora que expresa ambas cadenas.

Se construyeron plásmidos para su uso en construcción de vectores de expresión de modo que pudieran usarse secuencias de ADNc de cadena ligera kappa V y pesada V amplificadas por PCR para reconstruir minigenes de

40 cadena pesada y ligera completos. Estos plásmidos pueden usarse para expresar anticuerpos IgG_{1κ} o IgG_{4κ} completamente humanos. Los anticuerpos completamente humanos y quiméricos de la presente invención también incluyen anticuerpos IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM e IgD. Pueden construirse plásmidos similares para expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

45 Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se usan las características estructurales de anticuerpos anti DEC-205 de la invención para crear anticuerpos anti DEC-205 relacionados estructuralmente que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como, por ejemplo, unión con DEC-205 humano con una constante de afinidad de al menos 10^8 M^{-1} como se mide por resonancia de plasmón superficial; internalización después de unión con células dendríticas humanas que expresan DEC-205; localización en compartimentos de procesamiento de antígenos en células dendríticas humanas; activación de células dendríticas humanas que expresan DEC-205; reacción cruzada con DEC-205 en células dendríticas de primate no humano o las de otras especies; y generación o potenciación de linfocitos T humanos, tales como CTL, respuestas a un antígeno, preferentemente respuestas de CTL mediadas por rutas del MHC tanto de Clase I como de Clase II.

55 En una realización, puede combinarse una o más regiones CDR de los anticuerpos de la invención de forma recombinante con regiones marco conservadas y CDR conocidas para crear anticuerpos anti DEC-205, modificados por ingeniería recombinante, adicionales, de la invención. Las regiones marco conservadas variables de cadena pesada y ligera pueden derivar de la misma o diferentes secuencias de anticuerpo. Las secuencias de anticuerpo pueden ser las secuencias de anticuerpos de origen natural o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos. Véase Kettleborough *et al.*, Protein Engineering 4: 773 (1991); Kolbinger *et al.*, Protein Engineering 6: 971 (1993) y Carter *et al.*, documento WO 92/22653.

60

En consecuencia, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti DEC-205 que incluye:

65

preparar un anticuerpo que incluye (1) regiones marco conservadas de cadena pesada y CDR de cadena pesada, donde las CDR de cadena pesada comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 29, 30 y 31; y (2) regiones marco conservadas de cadena ligera y CDR de cadena ligera, donde las CDR de cadena ligera comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEC ID N°: 35, 36 y 37,

5 donde el anticuerpo conserva la capacidad para unirse con DEC-205. La capacidad del anticuerpo para unirse con DEC-205 puede determinarse usando ensayos de unión convencionales, tales como los expuestos en los Ejemplos (por ejemplo, un ELISA o un FLISA).

10 Se conoce bien en la técnica que los dominios CDR3 de cadena pesada y ligera de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno (véase, Hall *et al.*, J. Immunol., 149: 1605-1612 (1992); Polymenis *et al.*, J. Immunol., 152: 5318-5329 (1994); Jahn *et al.*, Immunobiol., 193: 400-419 (1995); Klimka *et al.*, Brit. J. Cancer, 83: 252-260 (2000); Beiboer *et al.*, J. Mol. Biol., 296: 833-849 (2000); Rader *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 8910-8915 (1998); Barbas *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 116: 2161-2162 (1994); Ditzel *et al.*, J. Immunol., 157: 739-749 (1996)). En consecuencia, los anticuerpos recombinantes de la invención preparados como se ha expuesto anteriormente preferentemente comprenden las CDR de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 3G9-2D2.

20 *Generación de anticuerpos que tienen secuencias modificadas*

En otra realización, las secuencias de región variable, o partes de las mismas, de los anticuerpos anti DEC-205 de la invención se modifican para crear anticuerpos anti DEC-205 estructuralmente relacionados que conservan la unión (es decir, con el mismo epítipo que el anticuerpo no modificado) y, por lo tanto, son funcionalmente equivalentes. Se conocen bien en la técnica métodos para identificar restos que pueden alterarse sin eliminar la unión a antígeno (véase, por ejemplo, Marks *et al.* (Biotechnology (1992) 10(7): 779-83 (diversificación de anticuerpos monoclonales por redistribución de regiones variables de cadena ligera, después regiones variables de cadena pesada con cambios de secuencia de CDR3 fijos), Jaspers *et al.* (1994) Biotechnology 12(9): 899-903 (selección de anticuerpos humanos de repertorio de presentación de fagos para un único epítipo de un antígeno), Sharon *et al.* (1986) PNAS USA 83(8): 2628-31 (mutagénesis dirigida de un resto de aminoácido invariante en el punto de unión de los segmentos variable-diverso de un anticuerpo); Casson *et al.* (1995) J. Immunol. 155(12): 5647-54 (evolución de la pérdida y cambio de la especificidad resultante de mutagénesis aleatoria de una región variable de cadena pesada de anticuerpo).

35 Las regiones CDR1, 2 y/o 3 de los anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden comprender la secuencia o las secuencias de aminoácidos exactas a las de los anticuerpos 3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5D12-5G1, 1G6-1G6 y 3A4-1C10 desvelados en el presente documento. Los anticuerpos que comprenden derivados de las secuencias de CDR exactas de 3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5D12-5G1, 1G6-1G6 y 3A4-1C10 pueden conservar aún la capacidad para unirse a DEC-205 eficazmente. Dichas modificaciones de secuencia pueden incluir una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificaciones de secuencia conservativas como se han descrito anteriormente. Las modificaciones de secuencia también pueden basarse en las secuencias consenso descritas anteriormente para las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 particulares de los anticuerpos 3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5D12-5G1, 1G6-1G6 y 3A4-1C10.

45 Los anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden estar compuestos de una o más CDR que son, por ejemplo, 90%, 95%, 98% o 99,5% idénticas a una o más CDR de los anticuerpos 3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5D12-5G1, 1G6-1G6 y 3A4-1C10.

50 Uno o más restos de una CDR pueden alterarse para modificar la unión para conseguir una velocidad de asociación de la unión más favorecida, una velocidad de asociación de la unión más favorecida, o ambas, de modo que se consiga una constante de unión idealizada. Usando esta estrategia, puede conseguirse un anticuerpo que tenga afinidad de unión ultra alta de, por ejemplo, 10^{10} M^{-1} o más. Pueden usarse técnicas de maduración de afinidad, bien conocidas en este campo y las descritas en el presente documento, para alterar la región o las regiones CDR seguido de exploración de las moléculas de unión resultantes para el cambio de unión deseado. En consecuencia, a medida que la o las CDR se alteran, los cambios en la afinidad de unión así como la inmunogenicidad pueden controlarse y puntuarse de modo que se consiga un anticuerpo optimizado para la mejor unión y baja inmunogenicidad combinada.

60 Además de, o en lugar de, modificaciones dentro de las CDR, también pueden realizarse modificaciones dentro de una o más de las regiones marco conservadas, FR1, FR2, FR3 y FR4, de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo, siempre que estas modificaciones no eliminen la afinidad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, se sustituye uno o más restos de aminoácidos no de línea germinal en las regiones marco conservadas de la región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo de la invención con un resto de aminoácido de línea germinal, es decir, el resto de aminoácido correspondiente en la secuencia de línea germinal humana para la región variable de cadena pesada o ligera, con la que el anticuerpo tiene identidad de secuencia significativa. Por ejemplo, una cadena de anticuerpo puede alinearse con una cadena de anticuerpo de línea germinal con la que comparte

identidad de secuencia significativa y los restos de aminoácidos que no coinciden entre la secuencia de marco conservado de anticuerpo y el marco conservado de cadena de línea germinal pueden sustituirse con restos correspondientes de la secuencia de línea germinal. Cuando un aminoácido difiere entre una región marco conservada variable de anticuerpo y una región marco conservada variable de secuencia de línea germinal humana equivalente, el aminoácido de marco conservado de anticuerpo debería habitualmente sustituirse por el aminoácido de secuencia de línea germinal humana equivalente si se espera razonablemente que el aminoácido quede dentro de una de las siguientes categorías:

- (1) un resto de aminoácido que se une de forma no covalente con el antígeno directamente,
- (2) un resto de aminoácido que está adyacente a una región CDR,
- (3) un resto de aminoácido que interacciona de otro modo con una región CDR (por ejemplo, está a una distancia de aproximadamente 3-6 Å de una región CDR como se determina por modelos informáticos) o
- (4) un resto de aminoácido que participa en la interfaz VL-VH.

Los restos que “se unen de forma no covalente con el antígeno directamente” incluyen aminoácidos en posiciones en las regiones marco conservadas que tienen una buena probabilidad de interactuar directamente con aminoácidos en el antígeno de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, por enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas y similares. En consecuencia, en una realización, un resto de aminoácido en la región marco conservada de un anticuerpo de la invención se sustituye con el resto de aminoácido de línea germinal correspondiente que se une de forma no covalente directamente con el antígeno.

Los restos que son “adyacentes a una región CDR” incluyen restos de aminoácidos en posiciones inmediatamente adyacentes a una o más de las CDR en la secuencia primaria del anticuerpo, por ejemplo, en posiciones inmediatamente adyacentes a una CDR como se define por Kabat, o una CDR como se define por Chothia (véase, por ejemplo, Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901 (1987)). En consecuencia, en una realización, un resto de aminoácido dentro de la región marco conservada de un anticuerpo de la invención se sustituye con un resto de aminoácido de línea germinal correspondiente que está adyacente a una región CDR.

Los restos que “interaccionan de otro modo con una región CDR” incluyen los que se determinan por análisis de estructura secundaria que están en una orientación espacial suficiente para afectar a una región CDR. Dichos aminoácidos generalmente tendrán un átomo de cadena lateral a una distancia de aproximadamente 3 unidades de angstrom (Å) de algún átomo en las CDR y debe contener un átomo que podría interactuar con los átomos de CDR de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, tales como las enumeradas anteriormente. En consecuencia, en una realización, un resto de aminoácido dentro de la región marco conservada de un anticuerpo de la invención se sustituye con el resto aminoácido de línea germinal correspondiente que interacciona de otro modo con una región CDR.

Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en el marco conservado son importantes para determinar la conformación de CDR (por ejemplo, capaz de interactuar con las CDR) en muchos anticuerpos (Chothia y Lesk, mencionado anteriormente, Chothia *et al.*, mencionado anteriormente y Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 175 (1990). Estos autores identificaron restos de marco conservados importantes para la conformación de CDR por análisis de las estructuras de varios anticuerpos conocidos. Los anticuerpos analizados quedaban en un número limitado de clases estructurales o “canónicas” basándose en la conformación de las CDR. Los restos marco conservados dentro de miembros de una clase canónica se denominan restos “canónicos”. Los restos canónicos incluyen los restos 2, 25, 29, 30, 33, 48, 64, 71, 90, 94 y 95 de la cadena ligera y los restos 24, 26, 29, 34, 54, 55, 71 y 94 de la cadena pesada. Pueden identificarse restos adicionales (por ejemplo, restos determinantes de estructura de CDR) de acuerdo con la metodología de Martin y Thorton (1996) J. Mol. Biol. 263: 800. Notablemente, se sabe que los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat) son capaces de interactuar con las CDR en muchos anticuerpos. Los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también interaccionan probablemente con las CDR. Pueden identificarse restos adicionales que pueden efectuar conformación de las CDR de acuerdo con la metodología de Foote y Winter (1992) J. Mol. Biol. 224: 487. Dichos restos se denominan restos de “vernier” y son los restos en la región marco conservada que quedan por debajo cerca de (es decir, que forman una “plataforma” bajo) las CDR.

Los restos que “participan en la interfaz VL-VH” o “restos de empaquetamiento” incluyen los restos en la interfaz entre VL y VH como se define, por ejemplo, en Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4592-66 (1985) o Chothia *et al.*, mencionado anteriormente.

Ocasionalmente, hay algo de ambigüedad acerca de si un aminoácido particular queda dentro de una o más de las categorías anteriormente mencionadas, En dichos casos, se producen anticuerpos variantes alternativos, uno de los cuales tiene esa sustitución particular, el otro no. Los anticuerpos variantes alternativos producidos de este modo pueden ensayarse en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento con respecto a la actividad deseada, y seleccionarse el anticuerpo preferido.

Son candidatos adicionales para sustitución dentro de la región marco conservada los aminoácidos que son poco

- habituales o “raros” para un anticuerpo en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente de la secuencia de línea germinal humana o de las posiciones equivalentes de anticuerpos más típicos. Por ejemplo, la sustitución puede ser deseable cuando el aminoácido en una región marco conservada del anticuerpo es rara para esa posición y el aminoácido correspondiente en la secuencia de línea germinal es común para esa posición en secuencias de inmunoglobulina; o cuando el aminoácido en el anticuerpo es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la secuencia de línea germinal también es raro, en relación con otras secuencias. Se contempla que reemplazando un aminoácido poco habitual con un aminoácido de la secuencia de línea germinal que resulta ser típico para los anticuerpos, el anticuerpo puede hacerse menos inmunogénico.
- El término “raro”, como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que aparece en esa posición en menos de aproximadamente el 20%, preferentemente menos de aproximadamente el 10%, más preferentemente menos de aproximadamente el 5%, aún más preferentemente menos de aproximadamente el 3%, aún más preferentemente menos de aproximadamente el 2%, y aún más preferentemente menos de aproximadamente el 1% de las secuencias en una muestra representativa de secuencias, y el término “común”, como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que aparece en más de aproximadamente el 25% pero habitualmente más de aproximadamente el 50% de las secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, todas las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada se agrupan respectivamente en “subgrupos” de secuencias que son especialmente homólogas entre sí y tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones críticas (Kabat *et al.*, mencionado anteriormente). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia de anticuerpo es “raro” o “común” entre secuencias, será con frecuencia preferible considerar solamente las secuencias en el mismo subgrupo que la secuencia de anticuerpo.

En general, las regiones marco conservadas de anticuerpos son habitualmente sustancialmente idénticas, y más habitualmente, idénticas a las regiones marco conservadas de las secuencias de línea germinal humana de las que derivaron. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región marco conservada realizan una contribución directa pequeña o no realizan ninguna a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. Por lo tanto, muchas sustituciones conservativas individuales de restos marco conservados pueden tolerarse, sin cambio apreciable de la especificidad o afinidad de la inmunoglobulina resultante. Por lo tanto, en una realización la región marco conservada variable del anticuerpo comparte al menos el 85% de identidad de secuencia con una secuencia de región marco conservada variable de línea germinal humana o consenso de dichas secuencias. En otra realización, la región marco conservada variable del anticuerpo comparte al menos el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de región marco conservada variable de línea germinal humana o consenso de dichas secuencias.

Además de unirse simplemente a DEC-205, un anticuerpo puede seleccionarse por su retención u otras propiedades funcionales de anticuerpos de la invención, tales como, por ejemplo:

- (a) unión con DEC-205 humano con una constante de afinidad de al menos 10^8 M^{-1} como se mide por resonancia de plasmón superficial;
- (b) internalización después de unión con células dendríticas humanas que expresan DEC-205;
- (c) localización en compartimentos de procesamiento de antígenos en las células dendríticas;
- (d) activación de células dendríticas humanas que expresan DEC-205;
- (e) reacción cruzada con DEC-205 en células dendríticas de primate no humano o las de otras especies;
- (f) generación o potenciación de las respuestas de linfocitos T humanos, preferentemente respuestas de linfocitos T mediadas por rutas del MHC tanto de Clase I como de Clase II;
- (g) generación o potenciación de respuestas de linfocitos CD4+, CD8+ o NKT humanos; y
- (h) induce la tolerancia de linfocitos T CD8⁺ periféricos.

Caracterización de anticuerpos monoclonales para DEC-205

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden caracterizarse con respecto a unión con DEC-205 usando una diversidad de técnicas conocidas. Generalmente, los anticuerpos se caracterizan inicialmente por ELISA. Brevemente, pueden recubrirse placas de microtitulación con DEC-205 purificado en PBS, y después bloquearse con proteínas irrelevantes tales como albúmina de suero bovino (BSA) diluida en PBS. Se añaden diluciones de plasma de ratones inmunizados con DEC-205 a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37 °C. Las placas se lavan con PBS/Tween 20 y después se incuban con un reactivo policlonal específico de Fc anti IgG humano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar, las placas se desarrollan con sustrato ABTS, y se analizan a DO de 405. Preferentemente, los ratones que desarrollan los títulos mayores se usarán para fusiones.

Puede usarse un ensayo de ELISA como se ha descrito anteriormente para explorar con respecto a anticuerpos, y de este modo, hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con el inmunógeno DEC-205. Después pueden subclonarse y caracterizarse adicionalmente hibridomas que se unen, preferentemente con alta afinidad, con DEC-205. Después puede elegirse un clon de cada hibridoma, que conserva la reactividad de las células parentales (por ELISA) para realizar un banco celular, y para purificación de anticuerpos.

Para purificar anticuerpos anti DEC-205, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en frascos rotatorios, matraces de agitación de dos litros u otros sistemas de cultivo. Pueden filtrarse los sobrenadantes y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) para purificar la proteína. Después del intercambio de tampón a PBS, puede determinarse la concentración por DO_{280} usando un coeficiente de extinción de 1,43 o preferentemente por análisis nefelométrico. El IgG puede comprobarse por electroforesis en gel y por un método específico de antígeno.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti DEC-205 seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos disponibles en el mercado (Pierce, Rockford, IL). Puede detectarse la unión de MAb biotinilado con una sonda marcada con estreptavidina. Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, pueden realizarse ELISA de isotipo usando técnicas reconocidas en este campo. Por ejemplo, pueden recubrirse pocillos de placas de microtitulación con $10 \mu\text{g/ml}$ de anti Ig durante una noche a 4°C . Después de bloquear con BSA al 5%, las placas se hacen reaccionar con $10 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificado, a temperatura ambiente durante 2 horas. Después puede hacerse reaccionar los pocillos con IgG1 u otras sondas conjugadas específicas de isotipo. Las placas se desarrollan y se analizan como se ha descrito anteriormente.

Para ensayar la unión de anticuerpos monoclonales con células vivas que expresan DEC-205, puede usarse citometría de flujo. Brevemente, se mezclan líneas celulares y/o PBMC humanas que expresan DEC-205 unido a membrana (cultivadas en condiciones de cultivo convencionales) con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene BSA 0,1% y NaN_3 0,01% a 4°C durante 1 hora. Después de lavar, las células se hacen reaccionar con anticuerpo anti IgG marcado con Fluoresceína en las mismas condiciones que la tinción de anticuerpo primaria. Las muestras pueden analizarse por instrumento FACScan usando propiedades de dispersión lateral y de la luz para seleccionar células individuales y se determina la unión de los anticuerpos marcados. Puede usarse un ensayo alternativo usando microscopía de fluorescencia (además de o en vez de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse por microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener sensibilidad reducida dependiendo de la densidad del antígeno.

Pueden ensayarse adicionalmente IgG anti DEC-205 con respecto a reactividad con el antígeno DEC-205 por transferencia de Western. Brevemente, pueden prepararse extractos celulares de células que expresan DEC-205 y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán con suero de ratón 20%, y se explorarán con los anticuerpos monoclonales para ensayar. La unión de IgG puede detectarse usando fosfatasa alcalina anti IgG y desarrollarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Los métodos para analizar la afinidad de unión, reactividad cruzada y cinética de unión de diversos anticuerpos anti DEC-205 incluyen ensayos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore™ usando un instrumento de SPR Biacore™ 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia), como se describe en el Ejemplo 2 en el presente documento.

II. Conjugados moleculares/inmunotoxinas

La presente invención proporciona una diversidad de conjugados moleculares terapéuticos (por ejemplo, conjugados de vacuna) que incluyen un antígeno, tal como un antígeno tumoral o viral, unido con un anticuerpo que se une a un receptor en una APC, por ejemplo, un anticuerpo que se une a DEC-205. Esto permite la dirección del antígeno a APC, tales como células que expresan DEC-205 (por ejemplo, células dendríticas y linfocitos B) para potenciar el procesamiento, la presentación y, en última instancia, una respuesta inmunitaria contra el antígeno o los antígenos, por ejemplo, una respuesta de CTL. Se muestra una representación esquemática de dicho conjugado en la Figura 8. En el ejemplo mostrado, el antígeno se fusiona genéticamente con el dominio CH3 de cada una de las cadenas pesadas de un anticuerpo anti DEC-205 sustancialmente completo. Sin embargo, se apreciará que el antígeno puede unirse como alternativa con otras partes de dicho anticuerpo o fragmento del mismo, y que también pueden emplearse otras formas de conjugación, tales como conjugación química, como se analiza adicionalmente posteriormente.

Los antígenos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, antígenos de enfermedad infecciosa y antígenos tumorales, contra los que se desean respuestas inmunitarias protectoras o terapéuticas, por ejemplo, antígenos expresados por una célula tumoral o un organismo patógeno o antígenos de enfermedad infecciosa. Por ejemplo, los antígenos adecuados incluyen antígenos asociados a tumor para la prevención o tratamiento de cánceres. Los ejemplos de antígenos asociados a tumor incluyen, pero sin limitación, secuencias que comprenden todas o parte de las secuencias de antígenos βhCG , gp100 o Pmel17, HER2/neu, WT1, mesotelina, CEA, gp100, MART1, TRP-2, melan-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiotipo, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, Tirosinasa, Telomerasa, SSX2 y MUC-1, y antígenos tumorales derivados de células germinales. Los antígenos asociados a tumor también incluyen los antígenos de grupo sanguíneo, por ejemplo, antígenos Le^a , Le^b , Le^x , Le^y , H-2, B-1, B-2. Como alternativa, puede incluirse más de un antígeno dentro de las construcciones de antígeno-anticuerpo de la invención. Por ejemplo, puede combinarse un antígeno MAGE con otros antígenos tales

como melanina A, tirosinasa y gp100 junto con adyuvantes tales como GM-CSF o IL-12, y unirse con un anticuerpo anti APC.

Otros antígenos adecuados incluyen antígenos virales para la prevención o tratamiento de enfermedades virales. Los ejemplos de antígenos virales incluyen, pero sin limitación, antígenos gag de VIH-1, env de VIH-1, nef de VIH-1, VHB (antígeno de superficie o núcleo), VPH, FAS, VHS-1, VHS-2, p17, ORF2 y ORF3. Los ejemplos de antígenos bacterianos incluyen, pero sin limitación, *Toxoplasma gondii* o *Treponema pallidum*. Los conjugados de antígeno bacteriano-anticuerpo de la invención pueden estar en el tratamiento o prevención de diversas enfermedades bacterianas tales como Carunco, Botulismo, Tétanos, Clamidia, Cólera, Difteria, Enfermedad de Lyme, Sífilis y Tuberculosis.

Las secuencias de los antígenos anteriores se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se proporciona un ejemplo de una secuencia de ADNc de MAGE-3 en el documento US 6.235.525 (Ludwig Institute for Cancer Research); se proporcionan ejemplos de secuencias de ácido nucleico y proteína de NY-ESO-1 en los documentos US 5.804.381 y US 6.069.233 (Ludwig Institute for Cancer Research); se proporcionan ejemplos de secuencias de ácido nucleico y proteína de Melan-A en los documentos US 5.620.886 y US 5.854.203 (Ludwig Institute for Cancer Research); se proporcionan ejemplos de secuencias de ácido nucleico y proteína de NY-BR-1 en los documentos US 6.774.226 y US 6.911.529 (Ludwig Institute for Cancer Research) y se proporcionan ejemplos de secuencias de ácido nucleico y proteína de NY-CO-58 en el documento WO 02090986 (Ludwig Institute for Cancer Research); está disponible un ejemplo de una secuencia de aminoácidos para la proteína HER-2/neu en GENBANK® N° de Referencia AAA58637; y está disponible una secuencia de nucleótidos (ARNm) para tipo antígeno carcinoembrionario 1 (CEA-1) humano en GENBANK® N° de Referencia NM_020219.

Un antígeno de VPH que puede usarse en las composiciones farmacéuticas y los métodos de la invención puede incluir, por ejemplo, un antígeno de VPH-16, un antígeno de VPH-18, un antígeno de VPH-31, un antígeno de VPH-33 y/o un antígeno de VPH-35; y es convenientemente un antígeno de VPH-16 y/o antígeno de VPH-18. Se describe un genoma de VPH-16 en *Virology*, 145: 181-185 (1985) y se describen secuencias de ADN que codifican VPH-18 en la Patente de Estados Unidos N° 5.840.306. Se describen antígenos de VPH-16 (por ejemplo, regiones serorreactivas de las proteínas E1 y/o E2 de VPH-16) en la Patente de Estados Unidos N° 6.531.127 y se describen antígenos de VPH-18 (por ejemplo, regiones serorreactivas de las proteínas L1 y/o L2 de VPH-18) en la Patente de Estados Unidos N° 5.840.306. De forma similar, está disponible un genoma completo para VHB en GENBANK® N° de Referencia NC_003977. El genoma del VHC se describe en la Solicitud de Patente Europea N° 318 216. El documento PCT/US90/01348 desvela información de secuencia de clones del genoma de VHC, secuencias de aminoácidos de proteínas virales de VHC y métodos para preparar y usar dichas composiciones para vacunas de VHC que comprenden proteínas de VHC y péptidos derivados de las mismas.

Pueden identificarse péptidos antigénicos de proteínas (es decir, los que contienen epítomos de linfocitos T) de una diversidad de maneras bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden predecirse epítomos de linfocitos T analizando la secuencia de la proteína usando algoritmos predictivos basados en web (BIMAS & SYFPEITHI) para generar péptidos de unión a MHC de clase I y clase II potenciales que coinciden con una base de datos interna de 10.000 péptidos de unión a MHC bien caracterizados previamente definidos por CTL. Los péptidos de alta puntuación pueden clasificarse y seleccionarse como "interesantes" basándose en su alta afinidad con una molécula de MHC dada.

Otro método para identificar péptidos antigénicos que contienen epítomos de linfocitos T es dividiendo la proteína en péptidos no solapantes de la longitud deseada o péptidos solapantes de longitudes deseadas que pueden producirse de forma recombinante, de forma sintética o, en ciertas situaciones limitadas, por escisión química de la proteína y ensayarse con respecto a propiedades inmunogénicas, por ejemplo, induciendo una respuesta de linfocitos T (es decir, proliferación o secreción de linfocinas).

Para determinar epítomos de linfocitos T precisos de la proteína mediante, por ejemplo, técnicas de mapeo fino, puede modificarse un péptido que tenga actividad estimuladora de linfocitos T y por lo tanto que comprenda al menos un epítomo de linfocitos T, como se determina por técnicas de biología de linfocitos T, mediante la adición o deleción de restos de aminoácidos en el extremo amino o carboxilo terminal del péptido y ensayarse para determinar un cambio en la reactividad de linfocitos T al péptido modificado. Si se descubre que dos o más péptidos que comparten un área de solapamiento en la secuencia proteica nativa tienen actividad estimuladora de linfocitos T humanos, como se determina por técnicas de biología de linfocitos T, pueden producirse péptidos adicionales que comprenden todos o una parte de dichos péptidos y estos péptidos adicionales pueden ensayarse por un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, se seleccionan péptidos y se producen de forma recombinante o sintética. Los péptidos se seleccionan basándose en diversos factores, incluyendo la fuerza de la respuesta de linfocitos T al péptido (índice de estimulación). Las propiedades físicas y químicas de estos péptidos seleccionados (por ejemplo, solubilidad, estabilidad) pueden después examinarse para determinar si los péptidos son adecuados para su uso en composiciones terapéuticas o si los péptidos requieren modificación.

Además, el conjugado de vacuna puede incluir uno o más agentes inmunoestimuladores que también potencian la respuesta inmunitaria contra el antígeno. Los conjugados de vacuna de antígeno-anticuerpo de la invención pueden

prepararse genética o químicamente. En cualquier caso, la parte de anticuerpo del conjugado puede consistir en el anticuerpo completo o una parte del anticuerpo, tal como el fragmento Fab o Fv de cadena sencilla. Además, puede incluirse más de un antígeno y/o agente inmunestimulador en el conjugado.

5 Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-antígeno contruidos químicamente usando una diversidad de reactivos de entrecruzamiento bien conocidos y fácilmente disponibles. Estos reactivos de entrecruzamiento pueden ser compuestos homofuncionales o heterofuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), que forma enlaces covalentes con diferentes cadenas laterales
10 de aminoácidos o carbohidratos reactivos en el anticuerpo antidendrítico y antígeno seleccionado. También pueden usarse otros agentes de acoplamiento y entrecruzamiento para generar enlaces covalentes, tales como proteína A, carbodiimida y o-fenilendimaleimida (oPDM); (véase por ejemplo Karpovsky *et al.* (1984) J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, MA *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos por Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) N° 78, 118-132); Brennan *et al.* (Science (1985) 229: 81-83) y Glennie *et al.* (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375). Son agentes de conjugación preferidos SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Los agentes inmunestimuladores también pueden unirse químicamente con los conjugados moleculares de la presente invención usando los mismos métodos de unión descritos anteriormente.

20 En otra realización, los anticuerpos de la presente invención se unen a un resto terapéutico, tal como una citosina, un fármaco o un radioisótopo. Cuando se conjugan con una citotoxina, estos conjugados de anticuerpo se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, destruya) células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamino platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Un anticuerpo de la presente invención puede conjugarse con un radioisótopo, por ejemplo, yodo radiactivo, para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con células dendríticas, tal como una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, o enfermedad de injerto contra huésped.

35 Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y el resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón γ ; o modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina 1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

45 Se conocen bien técnicas para conjugar dicho resto terapéutico, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

55 En otra realización, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para dirigir directamente células completas, por ejemplo, una célula tumoral, una célula efectora o un patógeno microbiano, a células dendríticas. Por ejemplo, pueden expresarse anticuerpos anti DEC-205 directamente en la superficie de una célula, por ejemplo, mediante transfección o transducción de una célula con un vector que contenga secuencias de ácido nucleico que codifiquen un anticuerpo de la invención. Esto puede realizarse, por ejemplo, transfectando la célula diana con un ácido nucleico que codifique una proteína de fusión que contenga un dominio transmembrana y un anticuerpo anti células dendríticas, o fragmento de unión a antígeno del mismo. Se describen métodos para generar dichos ácidos nucleicos, proteínas de fusión y células que expresan dichas proteínas de fusión, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 09/203.958. Como alternativa, pueden unirse anticuerpos anti células dendríticas, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, con una célula o un patógeno mediante el uso de enlazadores químicos, marcadores lipídicos u otros métodos relacionados (deKruif, J. *et al.* (2000) Nat. Med. 6:223-227; Nizard, P. *et al.* (1998) FEBS Lett. 433: 83-88). Pueden usarse células con anticuerpos anti DEC-205 anclados

en superficie para inducir respuestas inmunitarias específicas contra la célula, por ejemplo, una célula tumoral o un patógeno microbiano.

III. Composiciones farmacéuticas

5 En otra realización, la presente invención proporciona la composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales de la presente invención, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan composiciones que contienen moléculas
10 biespecíficas o conjugados moleculares que comprenden un anticuerpo de la presente invención. En una realización, las composiciones incluyen una combinación de múltiples anticuerpos aislados (por ejemplo, dos o más) de la invención. Preferentemente, cada uno de los anticuerpos de la composición se une con un epítipo distinto, preseleccionado, de DEC-205.

15 También pueden administrarse composiciones farmacéuticas de la invención en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes antiinflamatorios, DMARD (fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad), agentes inmunosupresores y productos quimioterapéuticos. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse junto con radioterapia. También está abarcada por la presente invención la coadministración con otros anticuerpos, tales como
20 anticuerpos específicos de CD4, o anticuerpos específicos de IL-2. Dichas combinaciones con anticuerpos específicos de CD4 o anticuerpos específicos de IL-2 se consideran particularmente útiles para tratar enfermedades autoinmunitarias y rechazos de trasplantes. Las combinaciones con anticuerpos para CTLA4, CD40 etc., son particularmente útiles en tratamientos de enfermedades infecciosas y cáncer.

25 En otra realización, puede combinarse un conjugado de vacuna que se internaliza rápidamente por APC con un anticuerpo monoclonal que potencia las actividades de células presentadoras de antígenos de células dendríticas, por ejemplo, liberación de citocinas inmunoestimuladoras.

30 Como se usa en el presente documento “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede usarse para recubrir un material para proteger el compuesto de la acción de
35 ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los ejemplos de adyuvantes que pueden usarse con los anticuerpos y construcciones de la presente invención incluyen: Adyuvante Incompleto y Adyuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); Adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, N. J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Filadelfia, Pa.); sales de aluminio tales como gel hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados de forma catiónica o aniónica; polifosfacenos; microesferas biodegradables; citocinas, tales como GM-CSF, interleucina-2, -7, -12 y otros factores similares; 3D-MPL; oligonucleótidos CpG; y monofosforil lípido A, por ejemplo monofosforil lípido A 3-des-O-acilado.

45 Están disponibles adyuvantes de MPL de Corixa Corporation (Seattle, Wash; véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094). Se conocen bien oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótidos de CpG no está metilado) y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y las Patentes de Estados Unidos Nº 6.008.200 y 5.856.462. También se describen secuencias de ADN inmunoestimuladoras, por ejemplo, en Sato *et al.*, Science 273: 352, 1996.

50 Los adyuvantes alternativos adicionales incluyen, por ejemplo, saponinas, tales como Quil A, o derivados de la misma, incluyendo QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.); Escina; Digitonina; o saponinas de *Gypsophila* o *Chenopodium quinoa*; Montanide ISA 720 (Seppic, Francia); SAF (Chiron, California, Estados Unidos); ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron); las series de adyuvantes SBAS (por ejemplo, SBAS-2 o SBAS-4, disponible de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica); Detox (Enhanzyn™) (Corixa, Hamilton, Mont.); RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) y otros aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos (AGP); adyuvantes de polioxietilén éter tales como los descritos en el documento WO 99/52549A1; imidazoquinolinas sintéticas tales como imiquimod [S-26308, R-837], (Harrison, *et al.*, Vaccine 19: 1820-1826, 2001; y resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos, *et al.*, Cellular immunology 204: 64-74, 2000; bases de Schiff de carbonilos y amins que se expresan constitutivamente en
60 superficies de células presentadoras de antígenos y linfocitos T, tales como tucaresol (Rhodes, J. *et al.*, Nature 377: 71-75, 1995); citocina, quimiocina y moléculas coestimuladoras como proteínas o péptidos, incluyendo por ejemplo citocinas proinflamatorias tales como interferón, GM-CSF, IL-1 alfa, IL-1 beta, TGF-alfa y TGF-beta, inductores de Th1 tales como interferón gamma, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21, inductores de Th2 tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y otros genes de quimiocinas y coestimuladores tales como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES,
65 TCA-3, CD80, CD86 y CD40L; ligandos dirigidos a agentes inmunoestimuladores tales como CTLA-4 y L-selectina, proteínas y péptidos estimuladores de la apoptosis tales como Fas; adyuvantes basados en lípidos sintéticos, tales

como vaxfectina, (Reyes *et al.*, Vaccine 19: 3778-3786, 2001) escualeno, alfa-tocoferol, polisorbato 80, DOPC y colesterol; endotoxina, [LPS], (Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3: 23-30, 2000); ligandos que desencadenan que receptores de Toll produzcan citocinas inductoras de Th1, tales como lipoproteínas Micobacterianas sintéticas, proteína Micobacteriana p19, peptidoglicano, ácido teicoico y lípido A; y CT (toxina del cólera, subunidades A y B) y LT (enterotoxina lábil por calor de *E. coli*, subunidades A y B), familia de proteínas de choque térmico (HSP) y LLO (listeriolisina O; documento WO 01/72329). Estos y diversos agonistas del Receptor de tipo Toll (TLR) se describen por ejemplo en Kanzler *et al.*, Nature Medicine, Mayo del 2007, Vol 13, N° 5.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no transmite ningún efecto toxicológico no deseado (véase por ejemplo, Berge, S. M., *et al.* (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanólicos fenil sustituidos, ácidos hidroxialcanólicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición de la presente invención puede administrarse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilvinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Están patentados o se conocen en general por los expertos en la materia muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar un compuesto de la invención por ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones de tampón acuoso. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales (Strejan *et al.* (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse en las composiciones compuestos activos complementarios.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración farmacológica. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Puede conseguirse absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración de esterilización. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. El caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado en congelación (liofilización) que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una única embolada, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las

exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden administrarse una vez o dos veces a la semana por inyección subcutánea o una vez o dos veces al mes por inyección subcutánea.

5 Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos para tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención se dicta por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular para conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

15 Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamin tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácidos fosfórico y similares.

20 Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se trate, y el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación generalmente será la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. En general, del cien por cien, esta cantidad variará de aproximadamente 0,001 por ciento a aproximadamente noventa por ciento del principio activo, preferentemente de aproximadamente 0,005 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferentemente de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

30 Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para administración vaginal incluyen también pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen vehículos que se sabe en la técnica que son apropiados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de composiciones de la presente invención incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda requerirse.

35 Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usan en el presente documento significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

45 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como etil oleato. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

50 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, mencionado anteriormente, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

60 Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, se pueden proporcionar solos o como una composición farmacéutica que contenga, por ejemplo, de 0,001 a 90% (más preferentemente, de 0,005 a 70%, tal como de 0,01 a 30%) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los

expertos en la materia.

- Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad de principio activo que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que se trate, y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Un médico o veterinario que tenga experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la invención empleadas en la composición farmacéutica a niveles menores del requerido para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será la cantidad del compuesto que es la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administradas próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Aunque es posible administrar un compuesto de la presente invención solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).
- Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: Patente de Estados Unidos N° 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para proporcionar medicación a una velocidad controlada; Patente de Estados Unidos N° 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente de Estados Unidos N° 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; Patente de Estados Unidos N° 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro farmacológico continuo; Patente de Estados Unidos N° 4.439.196, que desvela un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimentos de cámara múltiple; y Patente de Estados Unidos N° 4.475.196, que desvela un sistema de suministro de fármaco osmótico. Se conocen por los expertos en la materia muchos otros de estos implantes, sistemas de suministro y módulos.
- En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden formularse para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos para preparar liposomas, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan de forma selectiva a células u órganos específicos, potencian de este modo el suministro farmacológico dirigido (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). Los restos de dirección ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); receptor de proteína A tensioactivo (Briscoe *et al.* (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134), especies diferentes de las que pueden comprender las formulaciones de las invenciones, así como componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273. En una realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en una realización más preferida, los liposomas incluyen un resto de dirección. En una realización más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas se suministran por inyección de embolada a un sitio próximo al tumor o infección. La composición debe ser fluida en la medida en que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.
- La capacidad de un compuesto para inhibir cáncer puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir, dicha inhibición *in vitro* por ensayos conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño tumoral, o aliviar de otro modo síntomas en un sujeto. Un experto en la materia podría determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o vía de administración particular seleccionada.

La capacidad de los anticuerpos para potenciar la presentación de antígenos o inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra una diversidad de células o patógenos diana también puede evaluarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

5 La composición debe ser estéril y fluida en la medida en la que la composición pueda suministrarse por jeringa. Además de agua, el vehículo puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de recubrimiento tal como lecitina, mediante mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es
10 preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición. Puede proporcionarse absorción a largo plazo de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, un estearato de aluminio o gelatina.

15 Cuando el compuesto activo está protegido de forma adecuada, como se ha descrito anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable.

IV. Usos y métodos de la invención

20 En una realización, los anticuerpos, moléculas biespecíficas y conjugados moleculares de la presente invención pueden usarse para tratar y/o prevenir (por ejemplo, inmunizar contra) una diversidad de enfermedades y afecciones.

25 Una de las indicaciones de enfermedad primarias que pueden tratarse usando anticuerpos de la invención es cáncer. Esto incluye, pero sin limitación, cáncer de colon, melanoma, linfoma, carcinoma de próstata, carcinoma pancreático, carcinoma de vejiga, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, mastocitoma, adenocarcinoma mamario, leucemia o fibroblastoma reumatoide. Otra indicación de enfermedad primaria es enfermedades infecciosas incluyendo, pero sin limitación, VIH, Hepatitis (por ejemplo, A, B y C), Gripe, Herpes, Giardia, Malaria, Leishmania, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Otra indicación de enfermedad primaria incluye enfermedades autoinmunitarias.
30

35 Para su uso en terapia, los conjugados de vacuna de la invención pueden administrarse a un sujeto directamente (es decir, *in vivo*), solos o con un agente inmunoestimulador. En un aspecto, el agente inmunoestimulador está unido con el conjugado. Como alternativa, los conjugados pueden administrarse a un sujeto indirectamente poniendo en primer lugar en contacto los conjugados (por ejemplo, cultivando o incubando) con APC, tales como células dendríticas, y administrando después las células al sujeto (es decir, *ex vivo*). La puesta en contacto y suministro de los conjugados a APC, de modo que se procesen y presenten por las APC antes de la administración, también se denomina "carga" antigénica o celular. Se conocen bien en este campo técnicas para cargar antígenos en APC e incluyen, por ejemplo, Gunzer y Grabbe, Crit Rev Immunol 21 (1-3): 133-45 (2001) y Steinman, Exp Hematol 24(8): 859-62 (1996).
40

45 En todos los casos, los conjugados de vacuna y los agentes inmunoestimuladores se administran en una cantidad eficaz para ejercer su efecto terapéutico deseado. La expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz sería la cantidad necesaria para eliminar un tumor, cáncer, o infección bacteriana, viral o fúngica. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se trate, el conjugado particular que se administre, el tamaño del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto habitual en la materia puede determinar de forma empírica la cantidad eficaz de una molécula multiespecífica particular sin necesitar experimentación indebida.

50 Las vías preferidas de administración para los conjugados de vacuna incluyen, por ejemplo, inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intratecal). La inyección puede ser en una embolada o una infusión continua. Otras vías de administración incluyen administración oral.

55 Los conjugados de vacuna de la invención también pueden coadministrarse con adyuvantes y otros agentes terapéuticos. Se apreciará que el término "coadministrarse" como se usa en el presente documento incluye cualquiera o todas de administración simultánea, separada o secuencial de los anticuerpos y conjugados de la presente invención con adyuvantes y otros agentes, incluyendo administración como parte de un régimen de dosificación. Los conjugados se formulan típicamente en un vehículo farmacéuticamente aceptable solamente o en combinación con dichos agentes. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen soluciones, disolventes, medios de dispersión, agentes retardantes, emulsiones y similares. El uso de dichos medios para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Cualquier otro vehículo convencional adecuado para su uso con las moléculas queda dentro del alcance de la presente invención.
60

65 Los agentes adecuados para coadministración con los conjugados de vacuna incluyen otros anticuerpos, citotoxinas y/o fármacos. En una realización, el agente es un anticuerpo anti CTLA-4 que se sabe que ayuda a o induce respuestas inmunitarias. En otra realización, el agente es un agente quimioterapéutico. Los conjugados de vacuna

también pueden administrarse en combinación con radiación.

Los agentes quimioterapéuticos adecuados para coadministración con los anticuerpos y conjugados de la presente invención en el tratamiento de tumores incluyen, por ejemplo: taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes adicionales incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamin platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina) y temozolomida.

También pueden administrarse agentes que suprimen o inhiben las actividades inmunosupresoras, por ejemplo, por células inmunitarias (por ejemplo linfocitos T reguladores, linfocitos NKT, macrófagos, células supresoras derivadas de mieloides, células dendríticas inmaduras o supresoras) o factores supresores producidos por el tumor o células hospedadoras en el microambiente local del tumor (por ejemplo, TGFbeta, indolamin 2,3 dioxigenasa - IDO), con los anticuerpos y conjugados de la presente invención. Dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas farmacológicas tales como inhibidores de IDO tales como 1 metil triptófano o derivados.

En otra realización, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar a un sujeto con un trastorno autoinmunitario, del sistema inmunitario o inflamatorio, por ejemplo, un trastorno caracterizado por actividad inmunitaria aberrante o no deseada asociada con inmunomodulación por células dendríticas. Los trastornos autoinmunitarios, del sistema inmunitario e inflamatorios que pueden beneficiarse del tratamiento con los anti células dendríticas de la invención incluyen artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus mediada por el sistema inmunitario o de Tipo 1, miastenia grave, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, síndrome de Sjogren, psoriasis, lupus eritematoso, enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, esclerodermia/síndrome de Raynaud, síndrome de Reiter y enfermedades tiroideas autoinmunitarias tales como tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves. Por ejemplo, un sujeto que padece un trastorno autoinmunitario puede beneficiarse de la inhibición de la presentación mediada por células dendríticas de un autoantígeno.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse para prevenir y tratar todas las formas de alergia y trastorno alérgico, incluyendo sin limitación: trastornos alérgicos oftálmicos, incluyendo conjuntivitis alérgica, conjuntivitis primaveral, queratoconjuntivitis primaveral y conjuntivitis papilar gigante; trastornos alérgicos nasales, incluyendo rinitis alérgica y sinusitis; trastornos alérgicos óticos, incluyendo picor de las trompas de Eustaquio; trastornos alérgicos de las vías respiratorias superiores e inferiores, incluyendo asma intrínseco y extrínseco; trastornos alérgicos de la piel, incluyendo dermatitis, eccema y urticaria; y trastornos alérgicos del tracto gastrointestinal.

Los agentes adecuados para coadministración con los anticuerpos de la presente invención para el tratamiento de dichos trastornos inmunitarios incluyen, por ejemplo, agentes inmunosupresores tales como rapamicina, ciclosporina y FK506; agentes anti TNFa tales como etanercept, adalimumab e infliximab; y esteroides. Los ejemplos de esteroides naturales sintéticos específicos incluyen, por ejemplo: aldosterona, beclometasona, betametasona, budesonida, cloprednol, cortisona, cortivazol, desoxicortona, desonida, desoximetasona, dexametasona, difluorocortolona, fluorololona, flumetasona, flunisolida, fluocinolona, fluocinonida, butilo de fluocortina, fluorocortisona, fluorocortolona, fluorometolona, flurandrenolona, fluticasona, halcinonida, hidrocortisona, icometasona, meprednisona, metilprednisolona, parametasona, prednisolona, prednisona, tixocortol y triamcinolona.

Otros ejemplos de enfermedades que pueden tratarse usando los anticuerpos anti DEC-205 de la invención incluyen rechazo de trasplantes y enfermedad de injerto contra hospedador.

Rechazo de trasplantes

Durante años recientes ha habido una mejora considerable en la eficacia de las técnicas quirúrgicas para trasplantar tejidos y órganos tales como piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea. Quizás el principal problema destacado es la falta de agentes satisfactorios para inducir tolerancia inmunitaria en el receptor al aloinjerto u órgano trasplantado. Cuando se trasplantan células u órganos halógenos en un hospedador (es decir, el donante y receptor son individuos diferentes de la misma especie), el sistema inmunitario hospedador probablemente monte una respuesta inmunitaria a antígenos ajenos en el trasplante (enfermedad de hospedador contra injerto) lo que conduce a la destrucción del tejido trasplantado. Las células CD8+, células CD4+ y monocitos están implicados todos en el rechazo de tejidos de trasplante. Los anticuerpos de la presente invención son útiles para inhibir las respuestas inmunitarias inducidas por el aloantígeno mediadas por células dendríticas en el receptor evitando de este modo que dichas células participen en la destrucción del tejido u órgano trasplantado.

Enfermedad de injerto contra hospedador

Un uso relacionado para los anticuerpos de la presente invención está en la modulación de la respuesta inmunitaria implicada en enfermedad de "injerto contra hospedador" (GVHD). La GVHD es una enfermedad potencialmente letal que se produce cuando se transfieren células inmunológicamente competentes a un receptor alogénico. En esta situación, las células inmunocompetentes del donante pueden atacar tejidos en el receptor. Los tejidos de la piel, epitelio del intestino e hígado son dianas frecuentes y pueden destruirse durante el transcurso de la GVHD. La enfermedad presenta un problema especialmente grave cuando se trasplanta tejido inmunitario, tal como en el trasplante de médula ósea; pero también se ha presentado GVHD menos grave en otros casos, incluyendo trasplantes de corazón e hígado. Los agentes terapéuticos de la presente invención se usan para inhibir la actividad de células presentadoras de antígeno del hospedador, por ejemplo, células dendríticas.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deberían interpretarse como limitantes adicionales.

Ejemplos**Ejemplo 1****Generación de anticuerpos monoclonales humanos específicos de DEC-205 (HuMab)**

Se generaron anticuerpos monoclonales anti DEC-205 humanos inmunizando la cepa HC2/KCo7 de ratones transgénicos HuMab[®] ("HuMab" es una Marca Registrada de Medarex, Inc., Princeton, Nueva Jersey) con un antígeno DEC-205 humano soluble. Se generaron ratones HuMab HC2/KCo7 como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.770.429 y 5.545.806.

Antígeno e Inmunización: el antígeno fue una proteína de fusión soluble que comprendía un dominio extracelular de DEC-205 (que comprendía los diez dominios de unión a lectina) fusionado con un dominio Fc de anticuerpo. Se proporciona una secuencia de aminoácidos y ácido nucleico de DEC-205 humano en la Publicación de Patente de PCT N° WO 96023882 (Steinman). El antígeno se mezcló con Adyuvante Completo de Freund (Sigma) para la primera inmunización. A continuación, el antígeno se mezcló con Incompleto de Freund (Sigma). Se inmunizaron ratones adicionales con la proteína DEC-205 soluble en sistema de RIBI MPL más adyuvante TDM (Sigma). Se mezclaron 5-25 microgramos de antígeno DEC-205 recombinante soluble en PBS o 5×10^6 células CHO transfectadas para expresión en superficie de DEC-205 humano en PBS 1:1 con el adyuvante. Se inyectó a los ratones 100 microlitros del antígeno preparado en la cavidad peritoneal cada 14 días. A los animales que desarrollaron títulos anti DEC-205 se les proporcionó una inyección iv de 10 microgramos de antígeno DEC-205 recombinante soluble de tres a cuatro días antes de la fusión. Se recogieron bazos de ratón, y los esplenocitos aislados se usaron para preparación de hibridoma.

Preparación de Hibridoma: La línea celular de mieloma murino P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580) se usó para las fusiones. Se usó RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía FBS 10% para cultivar las células de mieloma. Se añadieron complementos de medios adicionales al medio de cultivo de Hibridoma, que incluía: Factor de Clonación de Hibridoma-Ongen 3% (Igen), FBS 10% (Sigma), L-glutamina (Gibco) gentamicina 0,1% (Gibco), 2-mercaptoetanol (Gibco), medio HAT (Sigma; hipoxantina $1,0 \times 10^{-4}$ M, aminopterin $4,0 \times 10^{-7}$ M, timidina $1,6 \times 10^{-5}$ M) o HT (Sigma; hipoxantina $1,0 \times 10^{-4}$ M, timidina $1,6 \times 10^{-5}$ M).

Las células del bazo se mezclaron con las células de mieloma 653 en una relación 6:1 y se sedimentaron por centrifugación. Se añadió polietilenglicol en gotas con mezclado cuidadoso para facilitar la fusión. Se permitió que los hibridomas crecieran durante una a dos semanas hasta que se establecieron colonias visibles. Se recogió sobrenadante y se usó para exploración inicial con respecto a IgG humano mediante ELISA usando una captura específica de cadena kappa humana y una detección específica de Fc humana. Después se ensayaron sobrenadantes positivos para IgG con respecto a especificidad de DEC-205 mediante citometría de flujo o usando un ELISA de DEC-205.

Se subclonaron y expandieron hibridomas que producían IgG de HuMab específico. Los HuMab producidos se purificaron después por cromatografía en columna de proteína A de acuerdo con condiciones convencionales que condujeron al aislamiento de varios anticuerpos de interés particular.

Ejemplo 2**Determinación de las constantes de afinidad y velocidad de HuMab por resonancia de plasmón superficial (SPR)**

Se examinó la afinidad de unión y cinética de unión de diversos anticuerpos anti DEC-205 humanos del Ejemplo 1 por análisis de resonancia de plasmón superficial Biacore[™] (SPR) usando un instrumento de SPR Biacore[™] 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) de acuerdo con las directrices del fabricante.

Se unió covalentemente proteína de fusión de DEC-205 humana recombinante purificada (o de control) con una microplaca sensora CM5 Biacore™ (dextrano carboximetilado unido covalentemente con una superficie de oro; Biacore N° de Producto BR-1000-14) usando química de acoplamiento de amina convencional con un Kit de Acoplamiento de Amina proporcionado por Biacore de acuerdo con las directrices del fabricante (Biacore N° de Producto BR-1000-50, que comprendía los reactivos de acoplamiento N-hidroxisuccinimida (NHS) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)). Se inmovilizaron niveles bajos de ligando para limitar cualquier efecto de transporte de masas de analitos en los parámetros cinéticos, de modo que el $R_{M\acute{A}X}$ observado estaba en el orden de 200 UR.

La unión se midió haciendo fluir los anticuerpos sobre la microplaca sensora en tampón HBS-NP (tampón HBS-N, Biacore N° de Producto BR-1003-69: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanosulfónico (HEPES) 0,24%, cloruro sódico 0,88%, agua cs, filtrado/desgasificado y preequilibrado a temperatura ambiente con una dilución 1:2000 de Tensioactivo P20) a concentraciones que variaban de 1,25 a 200 mM y a un caudal de 35 μ l/minuto. La cinética de asociación y disociación de anticuerpo-antígeno se siguió durante aproximadamente 300 a 600 segundos en cada caso.

Se realizaron controles correspondientes en cada caso usando una proteína no relacionada para resta de "fondo". Se usó una única inyección de NaOH 18 mM durante 17 segundos a 35 μ l/minuto como las condiciones de regeneración a lo largo del estudio.

Se usó el asistente de cinética de Biacore en cada caso para derivar parámetros cinéticos a partir de la serie de concentraciones del analito diluido en tampón de ejecución de HBS-NP. Las curvas de asociación y disociación se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando el software de asistente de cinética Biacore™ (Biacore AB) de acuerdo con las directrices del fabricante. Los parámetros de afinidad y cinéticos (con el fondo restado) como se determinan se muestran en la Tabla 1 a continuación. Para cada anticuerpo, las figuras mostradas son la media de dos series de experimentos separadas, usando microplacas sensoras preparadas por separado en cada caso, (donde k_a = constante de velocidad de asociación, k_d = constante de velocidad de disociación, K_D = constante de disociación en equilibrio (medida de afinidad), K_A = constante de asociación en equilibrio, $R_{m\acute{a}x}$ = señal de respuesta SPR máxima).

Tabla 1

N° de mAb	mAb ID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_A (1/M)	K_D (M)	$R_{M\acute{A}X}$ (UR)
N° 1	3A4-1C10	$1,5 \times 10^6$	$9,6 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{10}$	$6,6 \times 10^{-11}$	278
N° 2	5A8-1F1	$3,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{-9}$	172
N° 3	3C7-3A3	$1,7 \times 10^5$	$7,6 \times 10^{-4}$	$5,2 \times 10^8$	$5,6 \times 10^{-9}$	133
N° 4	2D3-1F5	$3,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{10}$	$6,8 \times 10^{-11}$	275
N° 5	3D6-2F4	$1,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^{-11}$	294
N° 6	5D12-5G1	$5,4 \times 10^5$	$3,2 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^9$	$7,0 \times 10^{-10}$	272
N° 7	1G6-1G6	$1,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^{-4}$	$4,7 \times 10^9$	$2,3 \times 10^{-10}$	249
N° 8	3G9-2D2	$9,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{-4}$	$4,7 \times 10^9$	$2,4 \times 10^{-10}$	268

Ejemplo 3

35 Unión de HuMab con células que expresan DEC-205 humano

La capacidad de los HuMab anti DEC-205 para unirse a DEC-205 en células CHO-S que expresan DEC-205 humano en su superficie se investigó por citometría de flujo de la siguiente manera.

Se ensayaron anticuerpos con respecto a su unión con células CHO-S que expresaban DEC-205 humano en su superficie. Se incubaron HuMab purificados con proteína A 3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5D12-5G1, 1G6-1G6 y 3A4-1C10 con las células CHO-S que expresaban DEC-205 humano, así como células de control CHO-S a 4 °C. Todos los anticuerpos se usaron a concentraciones de saturación. Después de 1 hora, las células se lavaron con PBS que contenía BSA 0,1% y NaN_3 (PBA) 0,05% y los anticuerpos unidos se detectaron incubando las células con una sonda específica de Fc anti IgG humano de cabra marcado con PE, a 4 °C. La sonda en exceso se lavó de las células con PBA y se determinó la fluorescencia asociada a célula mediante análisis usando un instrumento LSR™ (BD Biosciences, NJ, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en la Figura 1.

50

Como se muestra en la Figura 1, los HuMab demostraron unión de alto nivel con células CHO-S que expresaban DEC-205 humano. Estos datos demuestran que estos anticuerpos se unen eficazmente y específicamente con DEC-205 humano expresado en células CHO-S vivas en comparación con las células de control.

5 Ejemplo 4

Unión de HuMab con células dendríticas humanas

10 Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) por centrifugación en gradiente de densidad de preparaciones de aféresis de plaquetas Leukopak. Se aislaron monocitos por adherencia a matraces de cultivo tisular durante dos horas, y después se diferenciaron en células dendríticas por incubación con GM-CSF 2 ng/ml e IL-4 10 ng/ml en medio sin suero de macrófagos (Gibco) durante de 5 a 7 días.

15 La capacidad de HuMab anti DEC-205 para unirse con DEC-205 en células dendríticas humanas preparadas como anteriormente se investigó mediante citometría de flujo como sigue.

20 Se incubaron HuMab purificados con proteína A 3D6-2F2, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9, 3C7-3A3, 5D12-5G1, 1G6-1G6 y 3A4-1C10 y un control de isotipo (IgG humana) con las células dendríticas humanas a 4 °C. Todos los anticuerpos se usaron a concentraciones de saturación. Después de 1 hora, las células se lavaron con PBS que contenía BSA 0,1% y NaN₃ (PBA) 0,05% y los anticuerpos unidos se detectaron incubando las células con una sonda específica de Fc anti IgG humano de cabra marcado con PE, a 4 °C. La sonda en exceso se lavó de las células con PBA y la fluorescencia asociada a la célula se determinó mediante análisis usando un instrumento LSR™ (BD Biosciences, NJ, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en la Figura 2, que muestra que los HuMab demostraron unión de alto nivel con células dendríticas humanas en comparación con el control de isotipo.

Ejemplo 5

Ensayo de ELISA para determinar las características de unión de HuMab en DEC-205

30 Se recubrieron placas de microtitulación con proteína de fusión DEC-205/Fc soluble en PBS, y después se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5% en PBS. Se añadió HuMab purificados con proteína A y un control de isotipo a concentraciones de saturación y se incubó a 37 °C. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con un reactivo policlonal específico de Fc anti IgG humano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina a 37 °C. Después de lavar, las placas se desarrollaron con sustrato de pNPP (1 mg/ml), y se analizaron a DO 405-650 usando un lector de placas de microtitulación. Los resultados se muestran en la Figura 3, que muestra que los HuMab demostraron unión de alto nivel en comparación con el control de isotipo.

Ejemplo 6

Ensayo de internalización de anticuerpos

40 Se incubaron 5×10^5 células dendríticas derivadas de monocitos humanos por alícuota con IgG humano (1 mg/ml) para bloquear la unión no específica. Las células se incubaron después durante 30 minutos en hielo con 100 µg/ml de HuMab anti Dec-205 3G9-2D2 conjugado con FITC en tampón de bloqueo para unión, y posteriormente se transfirieron a 37 °C durante 0, 10, 30, 60 y 120 minutos para internalización. Se usó IgG1 humano conjugado con FITC a la misma concentración como control. Las células se lavaron después y se fijaron con paraformaldehído 1%. Las células fijadas se lavaron, se resuspendieron en agua y se centrifugaron por cytospin en portaobjetos de microscopio. Se tomaron imágenes con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta. Los resultados se muestran en la Figura 4, que muestra que los HuMab marcados con FITC demostraban internalización eficaz en las células dendríticas en comparación con el control.

Ejemplo 7

Secuenciación de anticuerpos

55 Como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, se purificaron HuMab de hibridomas que producían IgG de HuMab específico por cromatografía en columna de proteína A lo que conducía al aislamiento de ocho anticuerpos ("HuMab") de interés particular. Las regiones codificantes de V_H y V_L de los HuMab 3D6-2F4, 3D6-4C8, 3G9-2D2, 5A8-1F1, 2D3-1F5-2A9 (región V_H), 3C7-3A3, 1E6-3D10 (región V_H) y 5C3-2-3F6 se identificaron usando ARN de los hibridomas correspondientes. El ARN se transcribió de forma inversa a ADNc, las regiones codificantes V se amplificaron por PCR y se secuenció el producto de PCR. Las siguientes son las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los HuMab (en el caso de las secuencias de aminoácidos, están subrayadas las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR)).

65 Secuencia de ácido nucleico de V_H de 3D6-2F4 (VH3, locus 3-33; JH4) (SEC ID N°: 2):

atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgcctcttttaagaggtgccagtgctcaggtgcagctggaggagctgggggag
 gcgtggctccagcctgggaggtccctgagactcctctgtgcagcgtctggattcatcttcagtatctatggcatgactgggtccg
 ccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttataggtatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagg
 gccgattcaccatcctcagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtg
 tattactgtgcgagagctcctcactttgactactggggccaggaaccctggtcaccgtctcctcagctagc

Secuencia de aminoácidos de V_H de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 3) incluyendo el péptido señal:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSIYGM
HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARAPHFDYWGQGTLVTVSS

5

Secuencia de aminoácidos “madura” de V_H de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 4) excluyendo el péptido señal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSIYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTWY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPHFDYW GQGTLVTVSS

10

CDR1 de V_H de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 5): IYGMH

CDR2 de V_H de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 6): VIWYDGSNKYYADSVKG

15

CDR3 de V_H de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 7): APHFDY

Secuencia de ácido nucleico de V_L de 3D6-2F4 (VK1, locus L15; JK2) (SEC ID N°: 8):

atgggatggagctgtatcctgttctcgtggccacagcaaccgggtgccactccgacatccagatgaccagctcctccatcct
 cactgtctgcatctgttgagacagatccatcactgtcgggcgagtcagggtattagcagctggttagcctggtatcagca
 gaaaccagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttcaaagtgggggtccatcaaggttcagcggcagtg
 gatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgaacttattactccaacagtataatagtacc
 cgtacacttttggccaggggaccaagctggagatcaaactgacg

20

Secuencia de aminoácidos de V_L de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 9) incluyendo el péptido señal:

MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGISSW
LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY
CQQYNSYPYTFGQGKLEIK

25

Secuencia de aminoácidos “madura” de V_L de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 10) excluyendo el péptido señal:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGKLEIK

30

CDR1 de V_L de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 11): RASQGISSWLA

CDR2 de V_L de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 12): AASSLQS

CDR3 de V_L de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 13): CQQYNSYPYT

35

Secuencia de ácido nucleico de V_H de 3D6-4C8 (VH3, locus 3-33; JH4) (SEC ID N°: 14):

atggagtttgggctgagctgggtttctcgttgccttttaagaggtgccagtgccaggtgcagctggaggagctgggggag
 gcgtggccagcctgggaggtccctgagactcctgtgcagcgtctggattcatcttcagtatctatggcatgactgggtccg
 ccaggctccaggcaaggggctggagtggtggcagttatatggatgatggaagtaataataactatgcagactccgtgaagg
 gccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtg
 tattactgtgcgagagctcctcactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaaggccca
 tcggtcttccccctggcac

Secuencia de aminoácidos de V_H de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 15) incluyendo el péptido señal:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSIYGM
HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
 5 RAEDTAVYYCARAPHFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos “madura” de V_H de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 16) excluyendo el péptido señal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSIYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPHFDY
 10 GQGLTVTVSS

CDR1 de V_H de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 17): IYGMH

CDR2 de V_H de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 18): VIWYDGSNKYYADSVKG

15 CDR3 de V_H de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 19): APHFDY

Secuencia de ácido nucleico de V_L de 3D6-4C8 (VK1, locus L4; JK4) (SEC ID N°: 20):

atggacatgagggtccccgctcagctcctggggcttctgctgctctggctcccaggtgccagatgtgcatccagttgaccag
 tctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttggcgggcaagtcagggcattagcagtgctttagcct
 ggtatcagcagaaccagggaagctcctaagctcctgatctatgatgctccagttggaaagtgggggtcccatcaaggttca
 gcggcagtgatctgggacagattcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtcaacagttt
 20 aatagttaccctctcactttcggcgaggggaccaaggtggagatcaaa

Secuencia de aminoácidos de V_L de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 21) incluyendo el péptido señal:

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSAL
AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
QQFNSYPLTFGGGTKVEIK

25 Secuencia de aminoácidos “madura” de V_L de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 22) excluyendo el péptido señal:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

CDR1 de V_L de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 23): RASQGISSALA

CDR2 de V_L de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 24): DASSLES

CDR3 de V_L de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 25): QQFNSYPLT

5 Secuencia de ácido nucleico de V_H de 3G9-2D2 (VH3, locus 3-33; D no determinado; JH4) (SEC ID N°: 26):

**atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgccttttaagaggtgtccagtgctcaggtgcagctggaggagctgggggag
gcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaattatggcatgtactgggtccg
ccaggctccaggcaaggggctggagtggtggcagttatatggtatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagg
gccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtg
tattactgtgcgagagatctctggggatggtactttgactattggggccaggaacctggtcaccgtctcctcagctagc**

10 Secuencia de aminoácidos de V_H de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 27) incluyendo el péptido señal:

**MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM
YWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARDLWGWYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA**

Secuencia de aminoácidos “madura” de V_H de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 28) excluyendo el péptido señal:

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMYWVRQAPGKGLEWVAVIW
YDGSNKYYADSVKGRRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLWGWY
FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA**

15 CDR1 de V_H de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 29): NYGMY

20 CDR2 de V_H de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 30): VIWYDGSNKYYADSVKG

CDR3 de V_H de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 31): DLWGWYFDY

Secuencia de ácido nucleico de V_L de 3G9-2D2 (VK3, locus L6; JK4) (SEC ID N°: 32):

**atgggatggagctgtatcctctgttctcctgtggccacagcaaccgggtgtccactccgaaattgtgttgacacagctccagcca
ccctgtctttgtctccaggggaaagagccacctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctgttaccac
agaaacctggccaggctcccaggctcctcctatgatgatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtggcagt
gggtctgggacagacttctcctcaccatcagcagcctagagcctgaagatttgcagtttattactgtcagcagcgtcgcaact
ggccgctcacttccggcggaggaccaaggtggagatcaaacgtacg**

25 Secuencia de aminoácidos de V_L de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 33) incluyendo el péptido señal:

**MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW
YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQ
RRNWPLTFGGGTKVEIK**

30 Secuencia de aminoácidos “madura” de V_L de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 34) excluyendo el péptido señal:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRNWPLTFGGGGTKVEIK

CDR1 de V_L de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 35): RASQSVSSYLA

5 CDR2 de V_L de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 36): DASNRAT

CDR3 de V_L de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 37): QQRNWPLT

Secuencia de ácido nucleico de V_H de 5A8-1F1 (VH3, locus 3-33; JH2) (SEC ID N°: 38):

10

**atggagtttgggctgacctgggtttctctgttctctttaagaggtgccaggtgcaggtgcagctggaggctctgggggagg
cgtggccagcctgggaggccctgagactctctgtgcagcgtctggattcaccttcagtacctatggcatgcactgggtccg
ccaggctccaggcaaggggctggagtggtggcaattataggtatgatggaggtaataatactatgcagactccgtgaagg
gccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtg
tattactgtgcgagagacttctactggtacttcgatctctggggccgtggcacccctggcactgtctcctcagcctccaccaagg
cccatcggcttccccctggcaagg**

Secuencia de aminoácidos de V_H de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 39) incluyendo el péptido señal:

MEFGLTWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS**CAASGFTFSTYGM**
HWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGGNKYYADSVKGRFTISR**DNSKNTLYLQMNSL**
15 **RAEDTAVYYCARDFYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA**

Secuencia de aminoácidos "madura" de V_H de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 40) excluyendo el péptido señal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS**CAASGFTFSTYGM****HWVRQAPGKGLEWVAIIW**
YDGGNKYYADSVKGRFTISR**DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFYWYF**
20 **DLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA**

CDR1 de V_H de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 41): TYGMH

CDR2 de V_H de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 42): IIWYDGGNKYYADSVKG

25 CDR3 de V_H de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 43): DFYWYFDL

Secuencia de ácido nucleico de V_L de 5A8-1F1 (VK3, locus L6; JK1) (SEC ID N°: 44):

**atggaagccccagctcagcttctctctctctgctactctggctcccagataccaccggagaaattgtgtgacacagctcaccagc
caccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctctctgcagggccagtcagagtgttagcagctacttagcctgtacca
acagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtgga
gtgggtctgggacagactcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagatttgcagtttattactgtcagcagcgtaggac
gttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacga**

30

Secuencia de aminoácidos de V_L de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 45) incluyendo el péptido señal:

MEAPAQLLFLLLLWLPD^TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA
YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQ
RRTFGQGTKVEIK

Secuencia de aminoácidos “madura” de V_L de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 46) excluyendo el péptido señal:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
5 TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRRTFGQGTKVEIK

CDR1 de V_L de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 47): RASQSVSSYLA

CDR2 de V_L de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 48): DASNRAT

CDR3 de V_L de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 49): QQRRT

Secuencia de ácido nucleico de V_H de 3C7-3A3 (VH3, locus 3-33; JH2) (SEC ID N°: 50):

atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgcctctttaagaggtgccagtgccaggtgcagctggaggagctctgggggag
gcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctataacatgcactgggtcc
gccaggctccaggcaaggggctggagtggtggcatttatatggatgatggaagtaataaataactatggagactccgtgaag
ggccgattcaccatctccagagacaattccaaaaaacagctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgt
gtattactgtgcgagagaagagctggggatcgggtggtactcgcactctctggggccgtggcaccctggtcactgtctcctcagc
ctccaccaagggcccatcggctcttccccctggcac

Secuencia de aminoácidos de V_H de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 51) incluyendo el péptido señal:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYNM
HWVRQAPGKGLEWVAFIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
20 RAEDTAVYYCAREELGIGWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA

Secuencia de aminoácidos “madura” de V_H de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 52) excluyendo el péptido señal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYNMHWVRQAPGKGLEWVAFI
WYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREELGIGW
YFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA

CDR1 de V_H de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 53): SYNMH

CDR2 de V_H de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 54): FIWYDGSNKYYGDSVKG

CDR3 de V_H de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 55): EELGIGWYFDL

Secuencia de ácido nucleico de V_L de 3C7-3A3 (VK3, locus L6; JK1) (SEC ID N°: 56):

atggaagccccagctcagcttctctcctcctgctactctggtcctccagataaccaccggagaaattgtgttgacacagctcaccgc
caccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcctcctgcaggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtacca
acagaaacctggccaggctcccaggtcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtgcca
gtgggtctgggacagactcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagatttgcagtttactgtcagcagcgtaggac
gttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgtgtgctcctgc

Secuencia de aminoácidos de V_L de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 57) incluyendo el péptido señal:

MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA
YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ
5 RRTFGQGTKVEIK

Secuencia de aminoácidos "madura" de V_L de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 58) excluyendo el péptido señal:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
10 ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRRTFGQGTKVEIK

CDR1 de V_L de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 59): RASQSVSSYLA

CDR2 de V_L de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 60): DASN RAT

15 CDR3 de V_L de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 61): QQRRT

Secuencia de ácido nucleico de V_H de 2D3-1F5-2A9 (VH3, locus Orph-C16; JH3) (SEC ID N°: 62):

atggagtttgctgagctgggttctccttgtgctatattaaaagggtgccagtgtaggttcagctggtgcagctctgggggagg
cttggtagatcctggggggtccctgagactctcctgtgcaggctctggattcacctcagtaactatgctatgcactgggttcgcc
aggctccaggaaaaggctctggagtggtatcaactattggtactggtgggtggcacaccctatgcagactccgtgaaggccgc
ttcaccatctccagagacaatgccaagaactcctgtatcttcaaatgaacagcctgagagccgaggacatggctgtgtattact
gtgcattaagtctttgatgtctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcagcctccaccaagggccatcggtcttccc
20 cctggcac

Secuencia de aminoácidos de V_H de 2D3-1F5-2A9 (SEC ID N°: 63) incluyendo el péptido señal:

MEFVLSWVLLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAM
HWVRQAPGKGLEWVSTIGTGGGTPYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA
EDMAVYYCALSAFDVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLA

25 Secuencia de aminoácidos "madura" de V_H de 2D3-1F5-2A9 (SEC ID N°: 64) excluyendo el péptido señal:

EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMHWVRQAPGKGLEWVSTIGT
GGGTPYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCALSAFDVWGQ
GTMVTVSSASTKGPSVFPLA

CDR1 de V_H de 2D3-1F5-2A9 (SEC ID N°: 65): NYAMH

5 CDR2 de V_H de 2D3-1F5-2A9 (SEC ID N°: 66): TIGTGGGTPYADSVKG

CDR3 de V_H de 2D3-1F5-2A9 (SEC ID N°: 67): SAFDV

Secuencia de ácido nucleico de V_H de 1E6-3D10 (VH3, locus Orph-HC16; JH4) (SEC ID N°: 68):

10

Atggagtttgtgctgagctgggtttcctgttgctatattaaaggtgtccagtgtgaggttcagctggcagctctggggagg
cttggtagctcctggggggtccctgagactctcctgtgcaggctctggattcaccttcagtagctatgctatgactgggttcgcc
aggctccaggaaaaggtctggagtggtatcagctattggtactgggttacacatactatgtagactccgtgaaggccgatt
caccatctccagagacaatgccaagaagtcctgtatcttcaaatgaacagcctgagagccgaggacatggctgtgtattactgt
gcaagagagccgttttacgatatttactggttattccccatacttgactactggggccagggaaccctggcaccgtctcctca
gcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcac

Secuencia de aminoácidos de V_H de 1E6-3D10 (SEC ID N°: 69) incluyendo el péptido señal:

MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAM
HWVRQAPGKGLEWVSAIGTGGYTYVDSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLR
15 AEDMAVYYCAREPFYDILTGYSPFDYWGQGLVTVSS

Secuencia de aminoácidos "madura" de V_H de 1E6-3D10 (SEC ID N°: 70) excluyendo el péptido señal:

EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIGT
GGYTYVDSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAREPFYDILTG
20 YSPYFDYWGQGLVTVSS

CDR1 de V_H de 1E6-3D10 (SEC ID N°: 71): SYAMH

CDR2 de V_H de 1E6-3D10 (SEC ID N°: 72): AIGTGGYTYVDSVKG

25 CDR3 de V_H de 1E6-3D10 (SEC ID N°: 73): EPFYDILTGYSPFDY

Secuencia de ácido nucleico de V_H de 5C3-2-3F6 (VH3, locus 3-33; JH2) (SEC ID N°: 74):

Atggagtttgggctgagctgggtttcctcgttgctctttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctggaggctctggggag
gcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctataacatgcactgggtcc
gccaggctccaggcaagggtggagtggtggcagttatggtatgatggaagtaataaatactatggagactccgtgaag
ggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgt
gtattactgtgcgagagaagagctgggatcgggtgtacttcgatctctggggccgtggcaccctggcactgtctcctcagc
ctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcac

Secuencia de aminoácidos de V_H de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 75) incluyendo el péptido señal:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY
NMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREELGIGWYFDLWGRGTLVTVSS

5 Secuencia de aminoácidos “madura” de V_H de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 76) excluyendo el péptido señal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYNMHWVRQAPGKGLEWVA
VIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREELGIGW
YFDLWGRGTLVTVSS

10 CDR1 de V_H de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 77): SYNMH

CDR2 de V_H de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 78): VIWYDGSNKYYGDSVKG

CDR3 de V_H de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 79): EELGIGWYFDL

15 Secuencia de ácido nucleico de V_L de 5C3-2-3F6 VK (VK1, locus L18; JK5) (SEC ID N°: 80):

Atggacatgagggtccccgctcagctcctggggcttctgctgctctggctcccaggtgccagatgtgcatccagttgaccca
gtctccatctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcaagtcagggcattagcagtgctttagcc
tggtatcagcagaaccagggaagctcctaagctcctgatctatgatgcctccagttggaaagtgggggtcccatcaaggttc
agcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgcacttattactgtcaacagtt
taatagttaccctcacttggccaagggacacgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccat
ctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgctgcaagggc

20 Secuencia de aminoácidos de V_L de 5C3-2-3F6 VK (SEC ID N°: 81) incluyendo el péptido señal:

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRV
TITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIY
DASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQFNSYPHFGQGTRLEIK

Secuencia de aminoácidos “madura” de V_L de 5C3-2-3F6 VK (SEC ID N°: 82) excluyendo el péptido señal:

25 AIQLTQSPSSLSASVGDRV
TITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIY
DASSLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQFNSYPHFGQGTRLEIK

CDR1 de V_L de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 83): RASQGISSALA

CDR2 de V_L de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 84): DASSLES

30 CDR3 de V_L de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 85): QQFNSYPH

Secuencia de ácido nucleico de V_H de 5D12-5G1 (VH3, locus 3-33; JH2) (SEC ID N°: 86):

Atggagtttgggctgagctgggttttctcgttctctttaaagaggtgtccagtgctcaggtgcagctggaggagctgggggag
 gcgtggccagcctgggaggccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtcc
 gccaggctccaggcaaggggctggagtggtggcagttatatggtatgatggaagtaataaataactatgcagactccgtgaag
 ggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgt

 gtattactgtgcgagaggccccctcggtacttcgatctctggggccgtggcacccctggcactgtctcctcagcctccacaa
 gggcccatcggctcttccccctggcac

Secuencia de aminoácidos de VH de 5D12-5G1 (SEC ID N°: 87) incluyendo el péptido señal:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM
HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
 5 RAEDTAVYYCARGPPRYFDLWGRGTLVTVSS

Secuencia de aminoácidos "madura" de VH de 5D12-5G1 (SEC ID N°: 88) excluyendo el péptido señal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
YDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPPRYFD
 10 LWGRGTLVTVSS

CDR1 de VH de 5D12-5G1 (SEC ID N°: 89): SYGMH

CDR2 de VH de 5D12-5G1 (SEC ID N°: 90): VIWYDGSNKYYADSVKG

15 CDR3 de VH de 5D12-5G1 (SEC ID N°: 91): GPPRYFDL

Para referencia, las secuencias de aminoácidos de las secuencias de línea germinal correspondientes propuestas (asignadas sin prejuicio) son las siguientes:

20 Línea germinal L6 (SEC ID N°: 92):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
 TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP

25 Línea germinal L4 (SEC ID N°: 93):

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYP

Línea germinal L15 (SEC ID N°: 94):

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQ
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYP

Línea germinal V_H3-33 (SEC ID N°: 95):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
 YDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

Línea germinal Orph-C16 (SEC ID N°: 96):

**EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWV
SAIGTGGGTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR**

- 5 Los alineamientos de secuencia de las secuencias de V_L y V_H contra las secuencias de línea germinal correspondientes propuestas se muestran en la Figura 5, solamente para fines de ilustración.

Ejemplo 8

10 **Conjugado de vacuna dirigida a APC 3G9- β hCG**

Se generó un conjugado de vacuna dirigida a DEC-205 uniendo el antígeno β hCG con HuMab 3G9-2D2 (que también se ha determinado que es reactivo de forma cruzada con DEC-205 de cynomolgus) a partir del Ejemplo 7 anterior. Se consiguió la unión mediante unión covalente del antígeno con la cadena pesada del anticuerpo por fusión genética.

Se generó un plásmido que contenía los genes de neomicina y dihidrofolato reductasa que contenía la secuencia codificante de β hCG fusionada con la cadena pesada del anticuerpo 3G9-2D2 en el dominio CH3 y la cadena ligera de 3G9-2D2. La construcción plasmídica resultante se transfectó en células CHO usando un protocolo normalizado (Qiagen Inc, Valencia, CA). Las células transfectadas se seleccionaron en medio que contenía el antibiótico G418. Después de la selección, las células se clonaron por dilución limitante, y se usaron líneas clonales estables para generar bancos celulares para estudios adicionales. Para confirmar la expresión de las construcciones de 3G9- β hCG, se realizó análisis de Transferencia de Western de proteínas procesadas en SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Se observó que esta proteína de fusión era del peso molecular esperado y que se ensamblaba de forma apropiada (es decir que contenía tanto la fusión de cadena pesada como la cadena ligera). Específicamente, el conjugado de vacuna y el anticuerpo solo se analizaron por SDS-PAGE usando condiciones desnaturizantes y se detectaron mediante análisis de transferencia de Western. La mancha de transferencia se exploró después por separado usando IgG de cabra anti humano y con un mAb (US Biologicals) específico del péptido C terminal de β hCG. Los resultados confirmaron que las células CHO transformadas expresaban específicamente el conjugado de vacuna de 3G9- β hCG como se demuestra por el tamaño y composición apropiados del producto de fusión.

Ejemplo 9

35 **Actividad específica de antígeno usando conjugado de vacuna dirigido a APC 3G9- β hCG**

Las células capaces de presentación de antígenos eran de origen humano y variaron de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), monocitos (THP-1), células linfoblastoides B (C1R.A2, 1518 B-LCL) y DC derivadas de monocitos. Todas las células fueron positivas para expresión en superficie celular de DEC-205 como se evaluó por citometría de flujo.

El vector pk: 3G9-hCG β se transfectó en células CHO. Se seleccionaron clones estables con G418 y se subclonaron posteriormente. La proteína de fusión producida por las células (conjugado de vacuna 3G9- β hCG; Ejemplo 8) se recogió en el sobrenadante y se purificó sobre columna de Proteína A.

Se obtuvieron linfocitos T de leukopacks de donantes sanos normales. Se generaron linfocitos T específicos de antígeno *in vitro* por 2-3 estimulaciones semanales con DC autólogas dirigidas con 3G9-hCG β y enriquecidas para linfocitos T CD8+ y CD4+ antes de ensayar con respecto a actividad específica de antígeno con una diversidad de APC (como se ha descrito anteriormente) por GrB o ensayos de ELISpot de IFN γ (MabTech). Se añadieron las citocinas IL-7 e IL-2 para mantener la propagación del efector y la actividad cada 3-4 días. Se expandieron linfocitos T específicos de antígeno en el kit de expansión de linfocitos T Miltenyi-MACS durante 10-12 días en presencia de dosis baja de IL-2. Se usó CD40L (Alexis Biochemicals) para inducir la maduración de las DC. Como se muestra en la Figura 9A, se consiguieron respuestas de linfocitos T CD8+ en DC y monocitos (THP-1), así como células linfoblastoides B (Figura 9B). En consecuencia, la dirección antigénica mediante el receptor de DEC-205 a linfocitos B dio como resultado la estimulación de linfocitos T restringidos al MHC de clase I.

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> Celldex Therapeutics Inc., et al.

<120> ANTICUERPOS QUE SE UNEN CON CÉLULAS DENDRÍTICAS Y EPITELIALES 205 (DEC-205)

<130> CDJ-346PC

ES 2 445 755 T3

<140> Aún no asignado
 <141> Simultáneamente con la presente

5 <150> 61/002.253
 <151> 07-11- 2007

<150> 61/191.551
 <151> 10-09-2008

10 <160> 106

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1
 <211> 1722
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 1

```

Met Arg Thr Gly Trp Ala Thr Pro Arg Arg Pro Ala Gly Leu Leu Met
1          5          10

Leu Leu Phe Trp Phe Phe Asp Leu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ala Ala
20          25          30

Asn Asp Pro Phe Thr Ile Val His Gly Asn Thr Gly Lys Cys Ile Lys
35          40          45

Pro Val Tyr Gly Trp Ile Val Ala Asp Asp Cys Asp Glu Thr Glu Asp
50          55          60

Lys Leu Trp Lys Trp Val Ser Gln His Arg Leu Phe His Leu His Ser
65          70          75

Gln Lys Cys Leu Gly Leu Asp Ile Thr Lys Ser Val Asn Glu Leu Arg
85          90          95

Met Phe Ser Cys Asp Ser Ser Ala Met Leu Trp Trp Lys Cys Glu His
100         105         110

His Ser Leu Tyr Gly Ala Ala Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Asp Gly
115        120        125

His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys Lys Gly Gly
  
```


ES 2 445 755 T3

Ala His Ala Lys Cys Lys Ala Phe Ser Ser Asp Leu Ile Ser Ile His
 385 390 395 400

Ser Leu Ala Asp Val Glu Val Val Val Thr Lys Leu His Asn Glu Asp
 405 410 415

Ile Lys Glu Glu Val Trp Ile Gly Leu Lys Asn Ile Asn Ile Pro Thr
 420 425 430

Leu Phe Gln Trp Ser Asp Gly Thr Glu Val Thr Leu Thr Tyr Trp Asp
 435 440 445

Glu Asn Glu Pro Asn Val Pro Tyr Asn Lys Thr Pro Asn Cys Val Ser
 450 455 460

Tyr Leu Gly Glu Leu Gly Gln Trp Lys Val Gln Ser Cys Glu Glu Lys
 465 470 475 480

Leu Lys Tyr Val Cys Lys Arg Lys Gly Glu Lys Leu Asn Asp Ala Ser
 485 490 495

Ser Asp Lys Met Cys Pro Pro Asp Glu Gly Trp Lys Arg His Gly Glu
 500 505 510

Thr Cys Tyr Lys Ile Tyr Glu Asp Glu Val Pro Phe Gly Thr Asn Cys
 515 520 525

Asn Leu Thr Ile Thr Ser Arg Phe Glu Gln Glu Tyr Leu Asn Asp Leu
 530 535 540

Met Lys Lys Tyr Asp Lys Ser Leu Arg Lys Tyr Phe Trp Thr Gly Leu
 545 550 555 560

Arg Asp Val Asp Ser Cys Gly Glu Tyr Asn Trp Ala Thr Val Gly Gly
 565 570 575

Arg Arg Arg Ala Val Thr Phe Ser Asn Trp Asn Phe Leu Glu Pro Ala
 580 585 590

Ser Pro Gly Gly Cys Val Ala Met Ser Thr Gly Lys Ser Val Gly Lys
 595 600 605

Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser Ile Cys Lys
 610 615 620

ES 2 445 755 T3

Lys Met Ser Gly Pro Leu Gly Pro Glu Glu Ala Ser Pro Lys Pro Asp
625 630 635 640

Asp Pro Cys Pro Glu Gly Trp Gln Ser Phe Pro Ala Ser Leu Ser Cys
645 650 655

Tyr Lys Val Phe His Ala Glu Arg Ile Val Arg Lys Arg Asn Trp Glu
660 665 670

Glu Ala Glu Arg Phe Cys Gln Ala Leu Gly Ala His Leu Ser Ser Phe
675 680 685

Ser His Val Asp Glu Ile Lys Glu Phe Leu His Phe Leu Thr Asp Gln
690 695 700

Phe Ser Gly Gln His Trp Leu Trp Ile Gly Leu Asn Lys Arg Ser Pro
705 710 715 720

Asp Leu Gln Gly Ser Trp Gln Trp Ser Asp Arg Thr Pro Val Ser Thr
725 730 735

Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr Asp Ile Arg Asp Cys
740 745 750

Ala Ala Val Lys Val Phe His Arg Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe
755 760 765

Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Phe Ala Cys Asp Thr
770 775 780

Lys Leu Glu Trp Val Cys Gln Ile Pro Lys Gly Arg Thr Pro Lys Thr
785 790 795 800

Pro Asp Trp Tyr Asn Pro Asp Arg Ala Gly Ile His Gly Pro Pro Leu
805 810 815

Ile Ile Glu Gly Ser Glu Tyr Trp Phe Val Ala Asp Leu His Leu Asn
820 825 830

Tyr Glu Glu Ala Val Leu Tyr Cys Ala Ser Asn His Ser Phe Leu Ala
835 840 845

Thr Ile Thr Ser Phe Val Gly Leu Lys Ala Ile Lys Asn Lys Ile Ala
850 855 860

ES 2 445 755 T3

Asn Ile Ser Gly Asp Gly Gln Lys Trp Trp Ile Arg Ile Ser Glu Trp
865 870 875 880

Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe
885 890 895

Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys Thr Trp
900 905 910

Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys Leu Pro Phe
915 920 925

Ile Cys Glu Lys Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Lys Tyr Ser Pro Asp
930 935 940

Ser Ala Ala Lys Val Gln Cys Ser Glu Gln Trp Ile Pro Phe Gln Asn
945 950 955 960

Lys Cys Phe Leu Lys Ile Lys Pro Val Ser Leu Thr Phe Ser Gln Ala
965 970 975

Ser Asp Thr Cys His Ser Tyr Gly Gly Thr Leu Pro Ser Val Leu Ser
980 985 990

Gln Ile Glu Gln Asp Phe Ile Thr Ser Leu Leu Pro Asp Met Glu Al
995 1000 1005

Thr Leu Trp Ile Gly Leu Arg Trp Thr Ala Tyr Glu Lys Ile Asn
1010 1015 1020

Lys Trp Thr Asp Asn Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro
1025 1030 1035

Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu
1040 1045 1050

Glu Glu Ser Arg Tyr His Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys
1055 1060 1065

Ser Pro Phe Thr Gly Thr Trp Asn Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg
1070 1075 1080

His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys Ser Arg
1085 1090 1095

Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn

ES 2 445 755 T3

1100						1105						1110			
Leu	Tyr	Lys	Ile	Ile	Pro	Lys	Thr	Leu	Thr	Trp	His	Ser	Ala	Lys	
1115						1120					1125				
Arg	Glu	Cys	Leu	Lys	Ser	Asn	Met	Gln	Leu	Val	Ser	Ile	Thr	Asp	
1130						1135					1140				
Pro	Tyr	Gln	Gln	Ala	Phe	Leu	Ser	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Asn	
1145						1150					1155				
Ser	Ser	Leu	Trp	Ile	Gly	Leu	Phe	Ser	Gln	Asp	Asp	Glu	Leu	Asn	
1160						1165					1170				
Phe	Gly	Trp	Ser	Asp	Gly	Lys	Arg	Leu	His	Phe	Ser	Arg	Trp	Ala	
1175						1180					1185				
Glu	Thr	Asn	Gly	Gln	Leu	Glu	Asp	Cys	Val	Val	Leu	Asp	Thr	Asp	
1190						1195					1200				
Gly	Phe	Trp	Lys	Thr	Val	Asp	Cys	Asn	Asp	Asn	Gln	Pro	Gly	Ala	
1205						1210					1215				
Ile	Cys	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Asn	Glu	Thr	Glu	Lys	Glu	Val	Lys	Pro	
1220						1225					1230				
Val	Asp	Ser	Val	Lys	Cys	Pro	Ser	Pro	Val	Leu	Asn	Thr	Pro	Trp	
1235						1240					1245				
Ile	Pro	Phe	Gln	Asn	Cys	Cys	Tyr	Asn	Phe	Ile	Ile	Thr	Lys	Asn	
1250						1255					1260				
Arg	His	Met	Ala	Thr	Thr	Gln	Asp	Glu	Val	His	Thr	Lys	Cys	Gln	
1265						1270					1275				
Lys	Leu	Asn	Pro	Lys	Ser	His	Ile	Leu	Ser	Ile	Arg	Asp	Glu	Lys	
1280						1285					1290				
Glu	Asn	Asn	Phe	Val	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Tyr	Phe	Asn	Tyr	Met	
1295						1300					1305				
Ala	Ser	Trp	Val	Met	Leu	Gly	Ile	Thr	Tyr	Arg	Asn	Asn	Ser	Leu	
1310						1315					1320				
Met	Trp	Phe	Asp	Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Tyr	Thr	His	Trp	Arg	Ala	
1325						1330					1335				

ES 2 445 755 T3

Gly Arg Pro Thr Ile Lys Asn Glu Lys Phe Leu Ala Gly Leu Ser
1340 1345 1350

Thr Asp Gly Phe Trp Asp Ile Gln Thr Phe Lys Val Ile Glu Glu
1355 1360 1365

Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu Ala Cys Lys Ile Glu
1370 1375 1380

Met Val Asp Tyr Lys Glu Glu His Asn Thr Thr Leu Pro Gln Phe
1385 1390 1395

Met Pro Tyr Glu Asp Gly Ile Tyr Ser Val Ile Gln Lys Lys Val
1400 1405 1410

Thr Trp Tyr Glu Ala Leu Asn Met Cys Ser Gln Ser Gly Gly His
1415 1420 1425

Leu Ala Ser Val His Asn Gln Asn Gly Gln Leu Phe Leu Glu Asp
1430 1435 1440

Ile Val Lys Arg Asp Gly Phe Pro Leu Trp Val Gly Leu Ser Ser
1445 1450 1455

His Asp Gly Ser Glu Ser Ser Phe Glu Trp Ser Asp Gly Ser Thr
1460 1465 1470

Phe Asp Tyr Ile Pro Trp Lys Gly Gln Thr Ser Pro Gly Asn Cys
1475 1480 1485

Val Leu Leu Asp Pro Lys Gly Thr Trp Lys His Glu Lys Cys Asn
1490 1495 1500

Ser Val Lys Asp Gly Ala Ile Cys Tyr Lys Pro Thr Lys Ser Lys
1505 1510 1515

Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Cys Pro Ala Ala Lys
1520 1525 1530

Glu Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys
1535 1540 1545

Ser Asp Gln Ala Leu His Ser Phe Ser Glu Ala Lys Lys Leu Cys
1550 1555 1560

ES 2 445 755 T3

Ser Lys His Asp His Ser Ala Thr Ile Val Ser Ile Lys Asp Glu
 1565 1570 1575

Asp Glu Asn Lys Phe Val Ser Arg Leu Met Arg Glu Asn Asn Asn
 1580 1585 1590

Ile Thr Met Arg Val Trp Leu Gly Leu Ser Gln His Ser Val Asp
 1595 1600 1605

Gln Ser Trp Ser Trp Leu Asp Gly Ser Glu Val Thr Phe Val Lys
 1610 1615 1620

Trp Glu Asn Lys Ser Lys Ser Gly Val Gly Arg Cys Ser Met Leu
 1625 1630 1635

Ile Ala Ser Asn Glu Thr Trp Lys Lys Val Glu Cys Glu His Gly
 1640 1645 1650

Phe Gly Arg Val Val Cys Lys Val Pro Leu Gly Pro Asp Tyr Thr
 1655 1660 1665

Ala Ile Ala Ile Ile Val Ala Thr Leu Ser Ile Leu Val Leu Met
 1670 1675 1680

Gly Gly Leu Ile Trp Phe Leu Phe Gln Arg His Arg Leu His Leu
 1685 1690 1695

Ala Gly Phe Ser Ser Val Arg Tyr Ala Gln Gly Val Asn Glu Asp
 1700 1705 1710

Glu Ile Met Leu Pro Ser Phe His Asp
 1715 1720

<210> 2
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcat cttcagtatc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagtaataa atactatgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

5

10

ES 2 445 755 T3

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agctcctcac 360

tttgactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct cagctagc 408

<210> 3
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
 35 40 45

Ser Ile Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser
 130

10

<210> 4
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 4

ES 2 445 755 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Pro His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

5
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

10
 Ile Tyr Gly Met His
 1 5

15
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

20
 Gly
 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 7

ES 2 445 755 T3

Ala Pro His Phe Asp Tyr
 1 5

5 <210> 8
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

atgggatgga	gctgtatcat	cctgttcctc	gtggccacag	caaccggtgt	ccactccgac	60
atccagatga	cccagtcctc	atcctcactg	tctgcatctg	ttggagacag	agtcaccatc	120
acttgtcggg	cgagtcaggg	tattagcagc	tggtagcct	ggtatcagca	gaaaccagag	180
aaagccccta	agtcctgat	ctatgctgca	tccagtttgc	aaagtggggt	cccatcaagg	240
ttcagcggca	gtggatctgg	gacagatttc	actctcacca	tcagcagcct	gcagcctgaa	300
gattttgcaa	cttattactg	ccaacagtat	aatagttacc	cgtacacttt	tggccagggg	360
10 accaagctgg	agatcaaacg	tacg				384

15 <210> 9
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 445 755 T3

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

5

ES 2 445 755 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

5 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

10 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

20 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

25 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

30 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 14
 <211> 439
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14

ES 2 445 755 T3

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcat cttcagtatc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagtaataa atactatgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agctcctcac 360
 tttgactact gggggccaggg aaccctggtc accgtctcct cagcctccac caagggccca 420
 .
 tcggtcttcc ccctggcac 439

<210> 15
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 15

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
 35 40 45

Ser Ile Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

10

Leu Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 16
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

ES 2 445 755 T3

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Pro His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

5 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 17

Ile Tyr Gly Met His
 1 5

15 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

20 Gly

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

ES 2 445 755 T3

<400> 19

Ala Pro His Phe Asp Tyr
1 5

5

<210> 20
<211> 387
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 20

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc	60
agatgtgccca tccagttgac ccagttccca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga	120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag	180
aaaccagggga aagctcctaa gctcctgatc tatgatgcct ccagtttggga aagtggggtc	240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg	300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttacc tctcactttc	360
ggcggagggga ccaaggtgga gatcaaa	387

15

<210> 21
<211> 129
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

ES 2 445 755 T3

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys

<210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

5

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23

10 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 24

20 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

25 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 25

30 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26

ES 2 445 755 T3

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggagggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtaat tatggcatgt actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagtaataa atactatgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatctctgg 360
 ggatgggtact ttgactattg gggccagga accctgggtca ccgtctcctc agctagc 417

<210> 27
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27

5

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

10

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala
 145

<210> 28
 <211> 130
 <212> PRT

15

ES 2 445 755 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Leu Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala
130

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Asn Tyr Gly Met Tyr
1 5

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 35

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

10

<210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 36

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

20

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 37

Gln Gln Arg Arg Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

30

<210> 38
 <211> 447
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

ES 2 445 755 T3

atggagtttg ggctgacctg ggttttcctc gttgctcttt taagagggtg ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggccct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac ctccagtacc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcaattata tggatgatg gaggtaataa atactatgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agacttctac 360
 tgg tacttcg atctctgggg ccgtggcacc ctggtcactg tctctcagc ctccaccaag 420
 ggeccatcgg tcttccccct ggcaagg 447

<210> 39
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 39

Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Thr	Trp	Val	Phe	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	Arg	Gly	1	5	10	15
Val	Gln	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	20	25	30	
Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	35	40	45	
Ser	Thr	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	50	55	60	
Glu	Trp	Val	Ala	Ile	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Gly	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	65	70	75	80
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	85	90	95	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	100	105	110	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Phe	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Arg	115	120	125	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	130	135	140	
Phe	Pro	Leu	Ala	145															

10

ES 2 445 755 T3

<210> 40
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 40

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

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

Ala

10

<210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 41

Thr Tyr Gly Met His
 1 5

20

<210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 42

Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

ES 2 445 755 T3

<210> 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 43

 Asp Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5
 10
 <210> 44
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 44

 atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaggacgt tcggccaagg gaccaaggtg 360
 gaaatcaaac ga 372
 20
 <210> 45
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 45

ES 2 445 755 T3

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg
 100 105 110

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120

5 <210> 46
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 46

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Thr Phe Gly Gln
 85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100

<210> 47
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 47

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

Gln Gln Arg Arg Thr
 1 5

<210> 50
 <211> 454
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

ES 2 445 755 T3

```
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc      120
tgtgcagcgt ctggattcac ctccagtagc tataacatgc actgggtccg ccaggctcca      180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcatttata tggtatgatg gaagtaataa atactatgga      240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaaaaacac gctgtatctg      300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaagagctg      360
gggatcgggt ggtacttcga tctctggggc cgtggcacc cggtcactgt ctcctcagcc      420
tccaccaagg gcccatcggg ctccccctg gcac                                     454
```

```
<210> 51
<211> 151
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
```

5

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Glu Leu Gly Ile Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
 100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala
 130

5 <210> 53
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 53

10 Ser Tyr Asn Met His
 1 5

15 <210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 54

Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

20 Gly
 <210> 55
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 445 755 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

5 Glu Glu Leu Gly Ile Gly Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 56

<211> 454

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 56

 atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggtc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagatthttg cagthttatta ctgtcagcag cgtaggacgt tgggccaagg gaccaaggtg 360
 gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag 420
 ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgc 454

15

<210> 57

<211> 123

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

ES 2 445 755 T3

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg
 100 105 110

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120

<210> 58
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 58

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Thr Phe Gly Gln
 85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

10

ES 2 445 755 T3

5 <210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 59

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

10 <210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 60

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

20 <210> 61
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 61

Gln Gln Arg Arg Thr
 1 5

30 <210> 62
 <211> 433
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 62

atggagtttg tgctgagctg ggttctcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gttcagctgg tgcagctctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc 120
 tgtgcaggct ctggattcac cttcagtaac tatgctatgc actgggttcg ccaggctcca 180
 ggaaaaggtc tggagtgggt atcaactatt ggtactgggtg gtggcacacc ctatgcagac 240
 tccgtgaagg gccgcttcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300
 atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcattaag tgcttttgat 360
 gtctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc tcttcagcct ccaccaaggg cccatcggtc 420
 35 ttccccctgg cac 433

40 <210> 63
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 63

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 100 105 110

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

<210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 65

Asn Tyr Ala Met His
 1 5

10

<210> 66
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 66

Thr Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Pro Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

20

<210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 67

Ser Ala Phe Asp Val
 1 5

30

<210> 68

ES 2 445 755 T3

<211> 466
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 68

```
atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag      60
gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc      120
tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgctatgc actgggttcg ccaggctcca      180
ggaaaaggtc tggagtgggt atcagctatt ggtactgggt gttacacata ctatgtagac      240
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaagtcctt gtatcttcaa      300
atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcaagaga gccgttttac      360

gatattttga ctggttattc cccatacttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc      420
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcac                          466
```

10 <210> 69
<211> 143
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 69

ES 2 445 755 T3

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Val Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Glu Pro Phe Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Ser Pro
 115 120 125

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 70
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 70

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

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

10

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

Arg Glu Pro Phe Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Ser Pro Tyr Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 71

Ser Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 72
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 72

Ala Ile Gly Thr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 73

Glu Pro Phe Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Ser Pro Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 74
 <211> 454
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 74

ES 2 445 755 T3

atggagtttg ggctgagctg ggtttctctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggagggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tataacatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggtatgatg gaagtaataa atactatgga 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agaagagctg 360
 gggatcgggt ggtacttcga tctctggggc cgtggcaccg tggtcactgt ctccctcagcc 420
 tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcac 454

<210> 75
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 75

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Glu Leu Gly Ile Gly Trp Tyr Phe Asp Leu
 115 120 125
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

10

<210> 76
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

ES 2 445 755 T3

<400> 76

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Glu Leu Gly Ile Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 77
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 77

Ser Tyr Asn Met His
 1 5

15 <210> 78
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 78

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

25 <210> 79
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 79

ES 2 445 755 T3

Glu Glu Leu Gly Ile Gly Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

5 <210> 80
 <211> 475
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 80

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgcca tccagttgac ccagctccca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
 gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180
 aaaccagga aagctcctaa gctcctgatc tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc 240
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
 cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttacc tcacttcggc 360
 caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgca agggc 475

10

15 <210> 81
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 81

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 83
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 83

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 84
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 84

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

<210> 85
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 85

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His
 1 5

<210> 86
 <211> 445
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 445 755 T3

<400> 86

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcttc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc      120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca      180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggtatgatg gaagtaataa atactatgca      240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg      300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggccccctt      360
cggctactcg atctctgggg ccgtggcacc ctggctcactg tctcctcagc ctccaccaag      420
ggcccatcgg tcttccccct ggcac                                           445

```

5 <210> 87
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 87

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1           5           10           15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
          20           25           30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35           40           45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50           55           60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65           70           75           80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
          85           90           95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
          100           105           110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Pro Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
          115           120           125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130           135

```

15 <210> 88
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 445 755 T3

<400> 88

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Pro Pro Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 89
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 89

Ser Tyr Gly Met His

1 5

15 <210> 90
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 90

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

25 <210> 91
 <211> 8
 <212> PRT

ES 2 445 755 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 91

Gly Pro Pro Arg Tyr Phe Asp Leu
1 5

5

<210> 92

<211> 95

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 92

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

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

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

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

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

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

15

<210> 93

<211> 95

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 93

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 94
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 94

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

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

10

<210> 95
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 95

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 96

<211> 97

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 96

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 97

5

10

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /replace="Gly"

 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /replace="Thr"

 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Gly"

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> /note="Los restos proporcionados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /replace="Gly" o "Tyr"

 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace="Thr"

 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /replace="Pro"

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(9)
 <223> /note=" Los restos proporcionados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> /replace="Ala" o "Val"

 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 <223> /replace="Gly" o " "

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> /note=" Los restos proporcionados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

 60 <400> 98

 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 99
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /note="Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso sintética"
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /replace="Gly" o "Tyr" o "Ser" o "Pro" o " "
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> /replace="Trp" o "Ser" o "Arg"
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /replace="Ala" o "His"
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> /note="Los restos proporcionados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /replace="Leu" o "Val"
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> /note=" El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de la anotación para dicha posición"
 40
 <400> 99

Ala	Pro	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5	

 45
 <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <221> fuente
 <223> /note="Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso sintética"
 55
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Gly"
 60
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /replace="Val"
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> /note=" Los restos proporcionados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de la
 anotación para dichas posiciones"

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /replace="Trp" o "Ala"

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> /note=" El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de la
 anotación para dicha posición"

15

<400> 100

	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
	1				5					10	

20

<210> 101
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /note="Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso sintética"

30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /replace="Ala"

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /note=" El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de la
 anotación para dicha posición"

40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /replace="Ser"

45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Leu"

50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /replace="Gln" o "Glu"

55

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /replace="Ser"

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(7)
 <223> /note=" Los restos proporcionados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de las
 anotaciones para dichas posiciones"

ES 2 445 755 T3

<400> 101

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

5 <210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso sintética"

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /replace="Tyr" o "Phe"

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Asn"

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /replace="Ser" o "Asn"

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /replace="Trp" o " "

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /replace=" "

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Leu" o "His" o " "

45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /replace=" "

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(9)
<223> /note=" Los restos proporcionados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

55 <400> 102

Gln Gln Arg Arg Thr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

60 <210> 103
<211> 118
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 103

ES 2 445 755 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5

<210> 104
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 104

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 105
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 105

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

5

10

ES 2 445 755 T3

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Glu Leu Gly Ile Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 106

<211> 113

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 106

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 100 105 110

5

10

Ser

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une con el receptor 205 de Células Dendríticas y Epiteliales (DEC-205) humano y comprende:
- 5 una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 29;
una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°:30;
una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 31;
una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 35;
10 una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 36; y
una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 37.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 28 y una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 34 o una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera codificada por SEC ID N°: 26 y 32, respectivamente.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal humano que se une con DEC-205 humano con una constante de afinidad de al menos 10^6 M^{-1} como se determina por resonancia de plasmón superficial y muestra opcionalmente al menos una de las siguientes propiedades:
- 20 (a) se internaliza después de unirse con células dendríticas humanas que expresan DEC-205;
(b) genera o potencia respuestas de linfocitos T CD4+ humanos a un antígeno donde la respuesta de linfocitos T humanos está mediada opcionalmente por rutas del MHC de Clase I o Clase II o ambas;
(c) genera o potencia respuestas de CTL o NKT humanas a un antígeno;
25 (d) se localiza en compartimentos de procesamiento de antígenos en células dendríticas;
(e) induce tolerancia a linfocitos T CD8⁺ periféricos; o
(f) se une con un anticuerpo localizado en el dominio extracelular de DEC-205 humano.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 30 5. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que es un anticuerpo IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM o IgD; o es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo IgG1, un IgG2, un IgG3, un IgG4, un IgM, un IgA1, un IgA2, un IgAsec, un IgD y un IgE.
- 35 6. Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una célula transformada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.
- 40 8. Un conjugado molecular que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, unido con un antígeno, un alérgeno o un autoantígeno.
9. El conjugado molecular de la reivindicación 8, en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en un componente de un patógeno tal como VIH, VPH, VHB o VHC, un antígeno tumoral tal como βhCG , gp100 o Pmel17,
45 HER2/neu, WT1, mesotelina, CEA, gp100, MART1, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiotipo, Tirosinasa, Telomerasa, SSX2, MUC-1, MART1, melan-A, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3 y antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA).
10. El conjugado molecular de la reivindicación 8 o 9, que comprende además un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inmunosupresor, y un agente quimioterapéutico.
- 50 11. Una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 unido con una molécula que tiene una especificidad de unión que es diferente de la del anticuerpo.
- 55 12. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente eficaz, y que comprende opcionalmente además un agente terapéutico.
13. Uso de la composición de la reivindicación 12 o el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de cáncer o una enfermedad autoinmunitaria.
- 60 14. La composición de la reivindicación 11 o el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para uso en el tratamiento de un trastorno en un sujeto, la inmunización de un sujeto, o la inducción o potenciación de una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un sujeto.
- 65

15. Un método para detectar la presencia o ausencia de DEC-205 en una muestra biológica, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra biológica con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el anticuerpo está marcado con una sustancia detectable; y

5 (b) detectar el anticuerpo unido con DEC-205 para detectar de este modo la presencia o ausencia de DEC-205 en la muestra biológica.

Anticuerpos anti-DEC205 humanos que se unen a células CHO

Histogramas rellenos =
células CHO-S de control

Histogramas abiertos =
células CHO-S que
expresan huDEC-205

Todos los anticuerpos
usados a concentraciones
de saturación

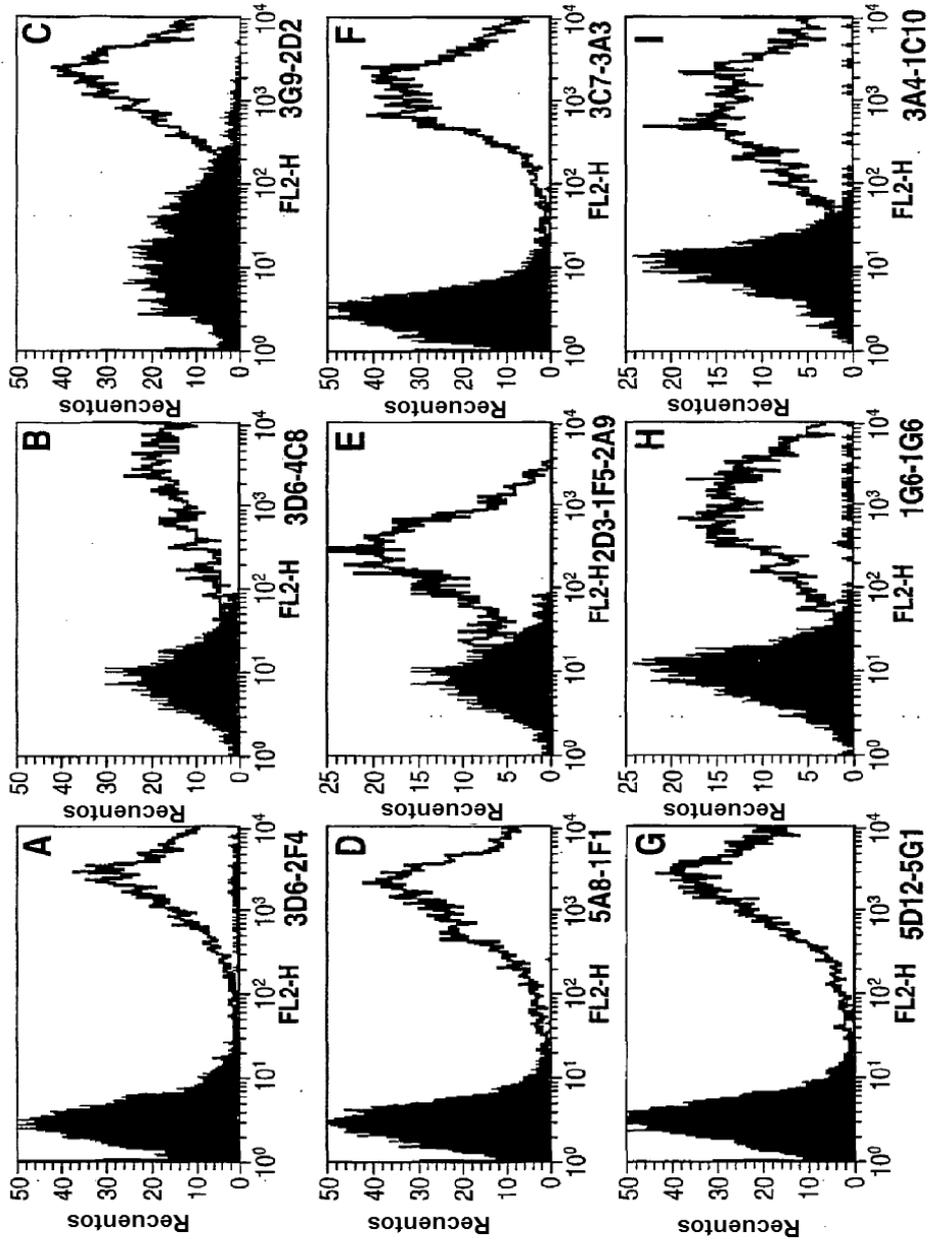


Fig. 1

Anticuerpos anti-DEC-205 humanos que se unen a células dendríticas humanas

Histogramas rellenos =
IgG humano de control
Histogramas abiertos =
mAb anti-DEC205 humano
Todos los anticuerpos
usados a concentraciones
de saturación

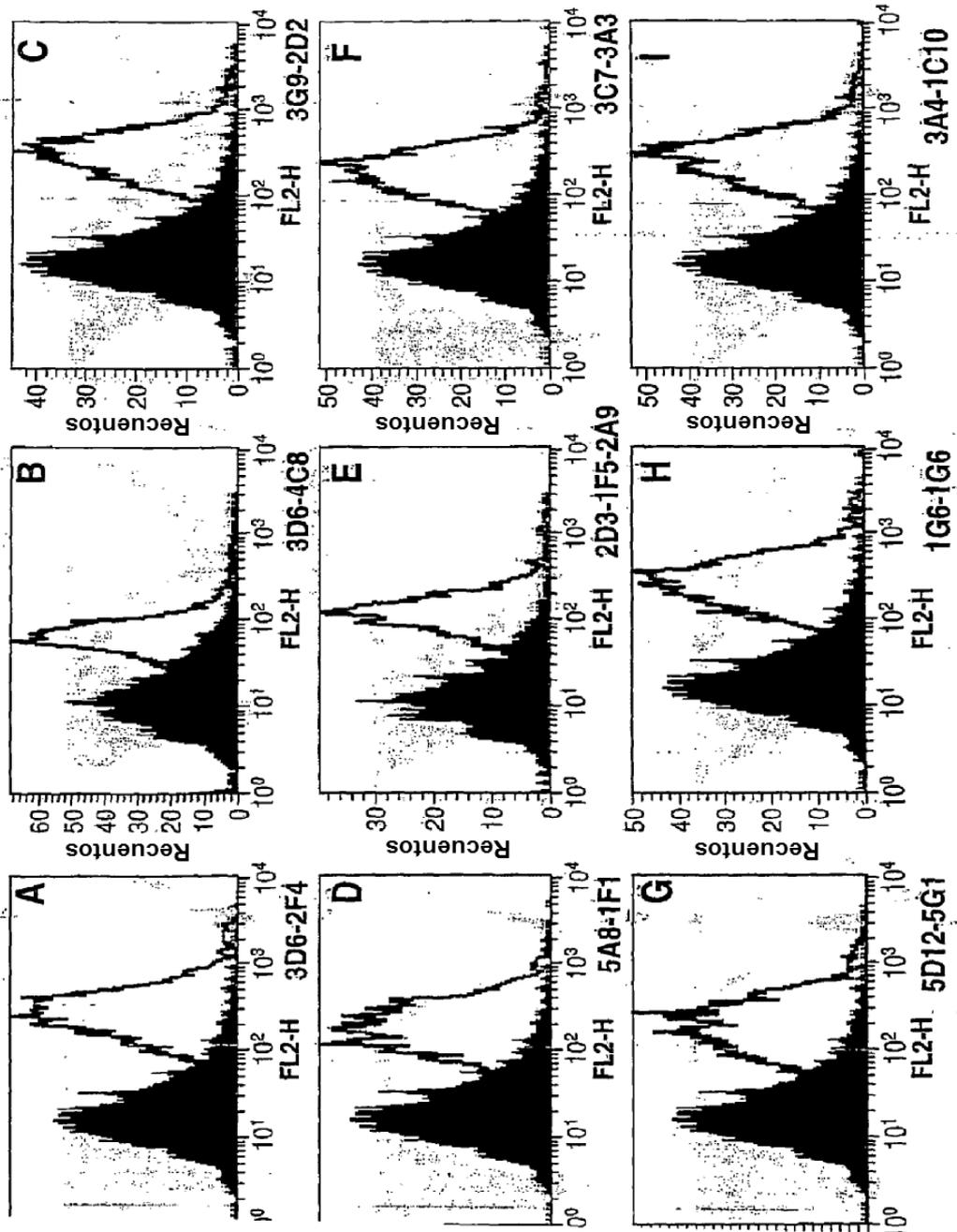


Fig. 2

Anticuerpos anti-DEC205 humanos que se unen a sDEC205 por ELISA

Todos los anticuerpos usados a concentraciones de saturación

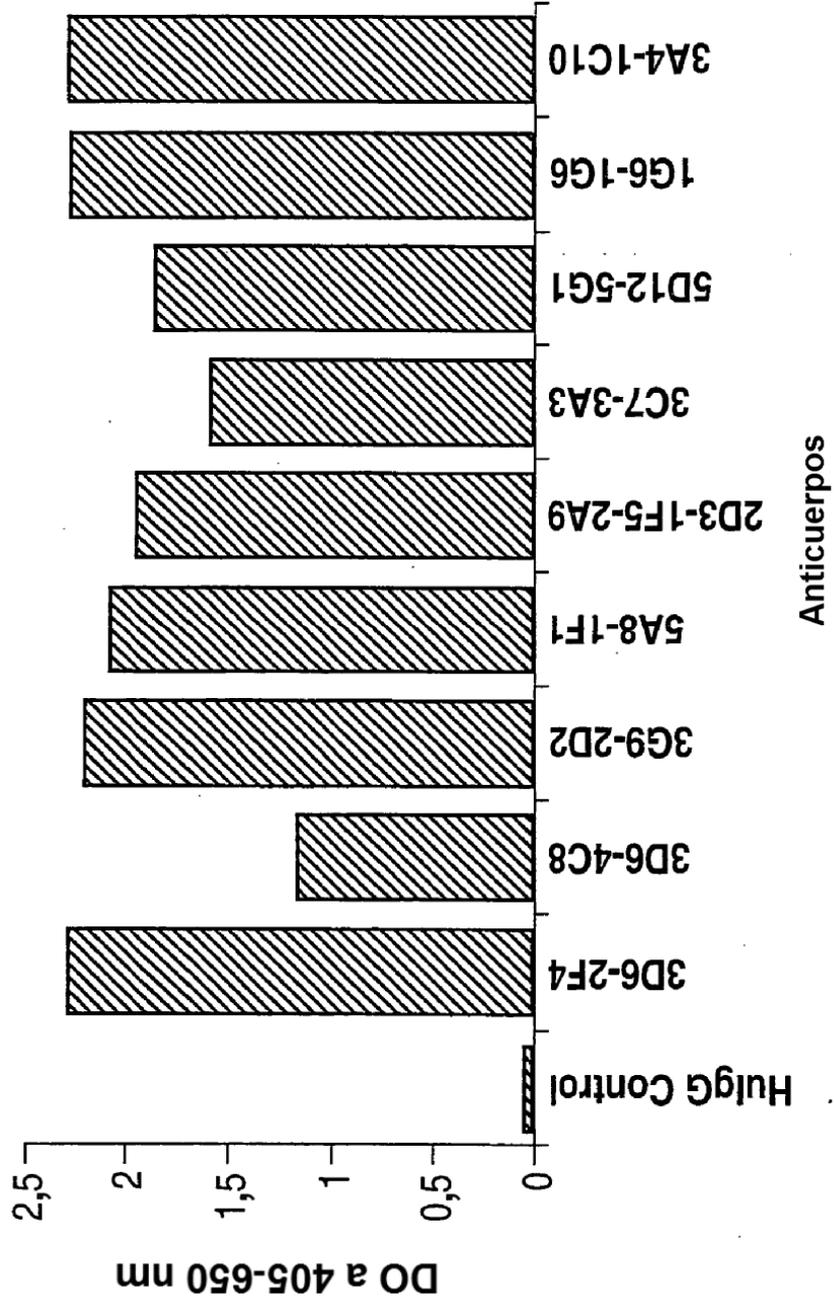
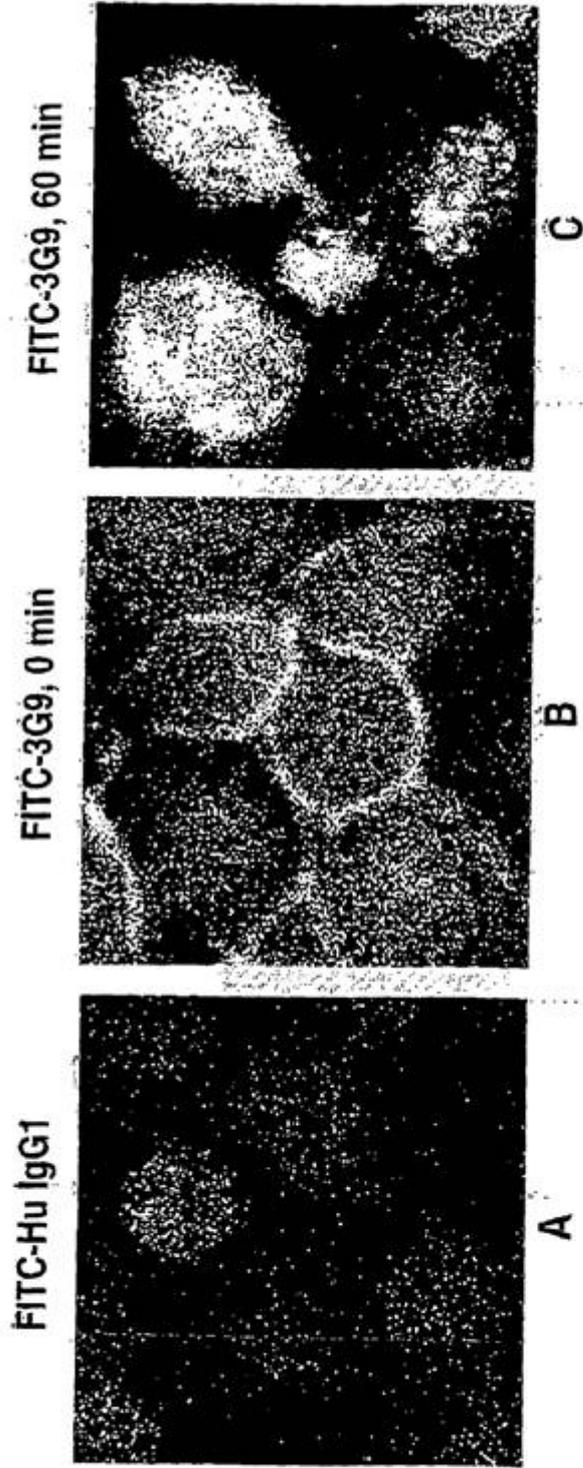


Fig. 3

Unión de mAb de Dec205 e internalización en células dendríticas



Se aplicó por pulsos a DC humanas derivadas de monocitos FITC-3G9-2D2 o IgG1 humano-FITC-durante 30 minutos en hielo. Las células se incubaron después a 37 °C durante los periodos indicados para permitir la internalización. Las imágenes se capturaron por microscopia confocal, y la tinción verde reveló la presencia de moléculas marcadas con FITC.

Fig. 4

Alineamientos de V_H y V_K humanas y secuencias de línea germinal

Alineamientos de V_K

	CDR1	V	CDR2	CDR3	J
<u>L6 germ.</u>					
3G9-2D2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKAPRLLIYDASNRATGTPAREFSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCQQRNWP				
5A8-1F1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKAPRLLIYDASNRATGTPAREFSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCQQRNWP				LTFGGGTKVEIK J _{H4}
3C7-3A3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKAPRLLIYDASNRATGTPAREFSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCQQR				LTFGGGTKVEIK J _{H4}
<u>L4 germ.</u>					
5C3-2-3F6	AIQLTQSPSSLASVGDRTVITICRASQGISLAWYQQKPKAPKLLIYDASLSEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLSLQPEDFAVYYCQQFNNSYP				
3D6-4C8	AIQLTQSPSSLASVGDRTVITICRASQGISLAWYQQKPKAPKLLIYDASLSEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLSLQPEDFAVYYCQQFNNSYP				HFTGGTRLEIK J _{H5}
	AIQLTQSPSSLASVGDRTVITICRASQGISLAWYQQKPKAPKLLIYDASLSEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLSLQPEDFAVYYCQQFNNSYP				LTFGGGTKVEIK J _{H5}
<u>L15 germ.</u>					
3D6-2F4	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITICRASQGISLAWYQQKPKAPKSLIYDASSLSQSEVPSRFSGSGSGTDFTLTISLSLQPEDFAVYYCQQFNNSYP				
	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITICRASQGISLAWYQQKPKAPKSLIYDASSLSQSEVPSRFSGSGSGTDFTLTISLSLQPEDFAVYYCQQFNNSYP				YTFGGGTRLEIK J _{H5}

Alineamientos de V_H

	CDR1	V	CDR2	CDR3	J
<u>3-33 germ.</u>					
3D6-2F4	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVYDGSNRYIADSVKGRFTISRDNSKNTILYQMNSLRRAEDTAVYYCAR				FDVWQGGTLVTVSS J _{H4}
3D6-4C8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVYDGSNRYIADSVKGRFTISRDNSKNTILYQMNSLRRAEDTAVYYCAR				FDVWQGGTLVTVSS J _{H4}
3G9-2D2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVYDGSNRYIADSVKGRFTISRDNSKNTILYQMNSLRRAEDTAVYYCAR				YFDVWQGGTLVTVSS J _{H4}
5A8-1F1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVYDGSNRYIADSVKGRFTISRDNSKNTILYQMNSLRRAEDTAVYYCAR				YWYFDVWGRGTLVTVSS J _{H2}
3C7-3A3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVYDGSNRYIADSVKGRFTISRDNSKNTILYQMNSLRRAEDTAVYYCAR				WYFDVWGRGTLVTVSS J _{H2}
5C3-2-3F6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVYDGSNRYIADSVKGRFTISRDNSKNTILYQMNSLRRAEDTAVYYCAR				WYFDVWGRGTLVTVSS J _{H2}
5D12-5G1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVYDGSNRYIADSVKGRFTISRDNSKNTILYQMNSLRRAEDTAVYYCAR				YFDVWGRGTLVTVSS J _{H2}
<u>O1ph-HC16</u>					
2D3-1F5-2A9	EVQLVDSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSYAMHWVRQAPKGLWVSAITGGGTGYIADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDMAVYYCAR				AFDVAWQGGTMVTVSS J _{H3}
1E6-3D10	EVQLVDSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSYAMHWVRQAPKGLWVSAITGGGTGYIADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDMAVYYCAR				YFDVWQGGTLVTVSS J _{H4}

Fig. 5

Secuencias Consenso de CDR de V_H Humanas

CDR1 de VH de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 5): IYGMH
 CDR1 de VH de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 17): IYGMH
 CDR1 de VH de 3G9--2D2 (SEC ID N°: 29): NYGMY
 CDR1 de VH de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 41): TYGMH
 CDR1 de VH de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 53): SYNMH
 CDR1 de VH de 2D3-1F5-2A9 (SEC ID N°: 65): NYAMH
 CDR1 de VH de 1E6-3D10: (SEC ID N°: 71): SYAMH
 CDR1 de VH de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 77): SYNMH
 CDR1 de VH de 5D12-5G1 (SEC ID N°: 89): SYGMH

CDR1 de VH CONSENSO (SEC ID N°: 97): (I,N,T,S) Y (G,N,A) M (H,Y)
 CDR2 de VH de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 6): VIWYDGSNKYYADSVKRG
 CDR2 de VH de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 18): VIWYDGSNKYYADSVKRG
 CDR2 de VH de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 30): VIWYDGSNKYYADSVKRG
 CDR2 de VH de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 42): IIWYDGSNKYYADSVKRG
 CDR2 de VH de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 54): FIWYDGSNKYYGDSVKRG
 CDR2 de VH de 2D3-1F5-2A9 (SEC ID N°: 66): TIGTGGTPIYA-DSVKRG
 CDR2 de VH de 1E6-3D10 (SEC ID N°: 72): AIGTGGYTYVV-DSVKRG
 CDR2 de VH de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 78): VIWYDGSNKYYGDSVKRG
 CDR2 de VH de 5D12-5G1 (SEC ID N°: 90): VIWYDGSNKYYADSVKRG

CDR2 de VH CONSENSO (SEC ID N°: 98): (V,I,F,T,A) I (W,G) (Y,T) (D,G)
G (S,G,Y) (N, T) (K, P) Y (Y,A,V) (A, G,-) D S V K G

CDR3 de VH de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 7): APHFDY
 CDR3 de VH de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 19): APHFDY
 CDR3 de VH de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 31): DLWGWIYFDY
 CDR3 de VH de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 43): DFYWIYFDL
 CDR3 de VH de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 55): EELGIGWIYFDL
 CDR3 de VH de 2D3-1F5-2A9, (SEC ID N°: 67): SAFDV
 CDR3 de VH de 1E6-3D10 (SEC ID N°: 73): EPFYDILTGYSPYFDY
 CDR3 de VH de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 79): EELGIGWIYFDL
 CDR3 de VH de 5D12-5G1 (SEC ID N°: 91): GPPRYFDL

CDR3 de VH (NÚCLEO) CONSENSO (SEC ID N°: 99): (A, G, Y, S, P, -) (P,W,S,R) (Y,A,H) FD (Y,L,V)
 (donde "-" indica la opción de ningún resto de aminoácidos presente en esa posición)

Fig. 6

Secuencia consenso de CDR de VL Humanas

CDR1 de VL de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 11):	RASQGISSWLA
CDR1 de VL de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 23):	RASQGISSALA
CDR1 de VL de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 35):	RASQSVSSYLA
CDR1 de VL de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 47):	RASQSVSSYLA
CDR1 de VL de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 59):	RASQSVSSYLA
CDR1 de VL de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 83):	RASQGISSALA
CDR1 de VL CONSENSO (SEC ID N°: 100): R A S Q (S,G) (I,V) S S (Y,W,A) L A	
CDR2 de VL de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 12):	AASSIQS
CDR2 de VL de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 24):	DASSIES
CDR2 de VL de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 36):	DASNRAT
CDR2 de VL de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 48):	DASNRAT
CDR2 de VL de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 60):	DASNRAT
CDR2 de VL de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 84):	DASSIES
CDR2 de VL de CONSENSO (SEC ID N°: 101): (D,A) A S (N,S) (R,L) (A,Q,E) (T,S)	
CDR3 de VL de 3D6-2F4 (SEC ID N°: 13):	QQYNSYPYT
CDR3 de VL de 3D6-4C8 (SEC ID N°: 25):	QQFNYSYPLT
CDR3 de VL de 3G9-2D2 (SEC ID N°: 37):	QQRRNWPLT
CDR3 de VL de 5A8-1F1 (SEC ID N°: 49):	QQRRT----
CDR3 de VL de 3C7-3A3 (SEC ID N°: 61):	QQRRT----
CDR3 de VL de 5C3-2-3F6 (SEC ID N°: 85):	QQFNYSYPH-
CDR3 de VL de CONSENSO (SEC ID N°: 102): Q Q (R,Y,F) (R,N) (T,S,N) (Y,W,-) (P,-) (Y,L,H,-) (T,-)	

(donde "-" indica la opción de ningún resto de aminoácidos presente en esa posición)

Fig. 7

Ejemplo de construcción de vacuna dirigida a APC de fusión de anti-DEC-205/antígeno (representación esquemática)

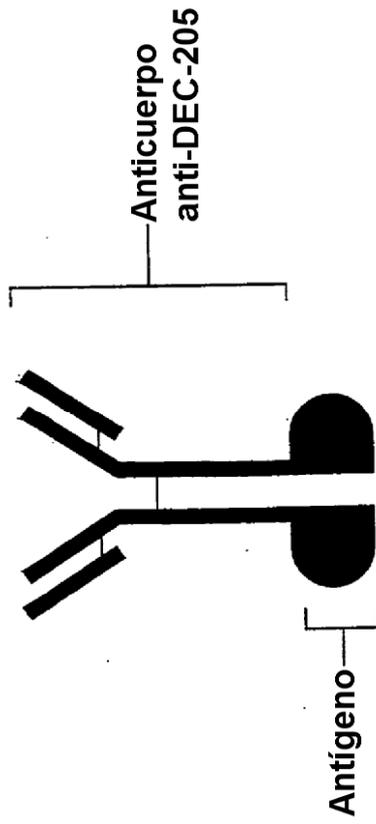


Fig. 8

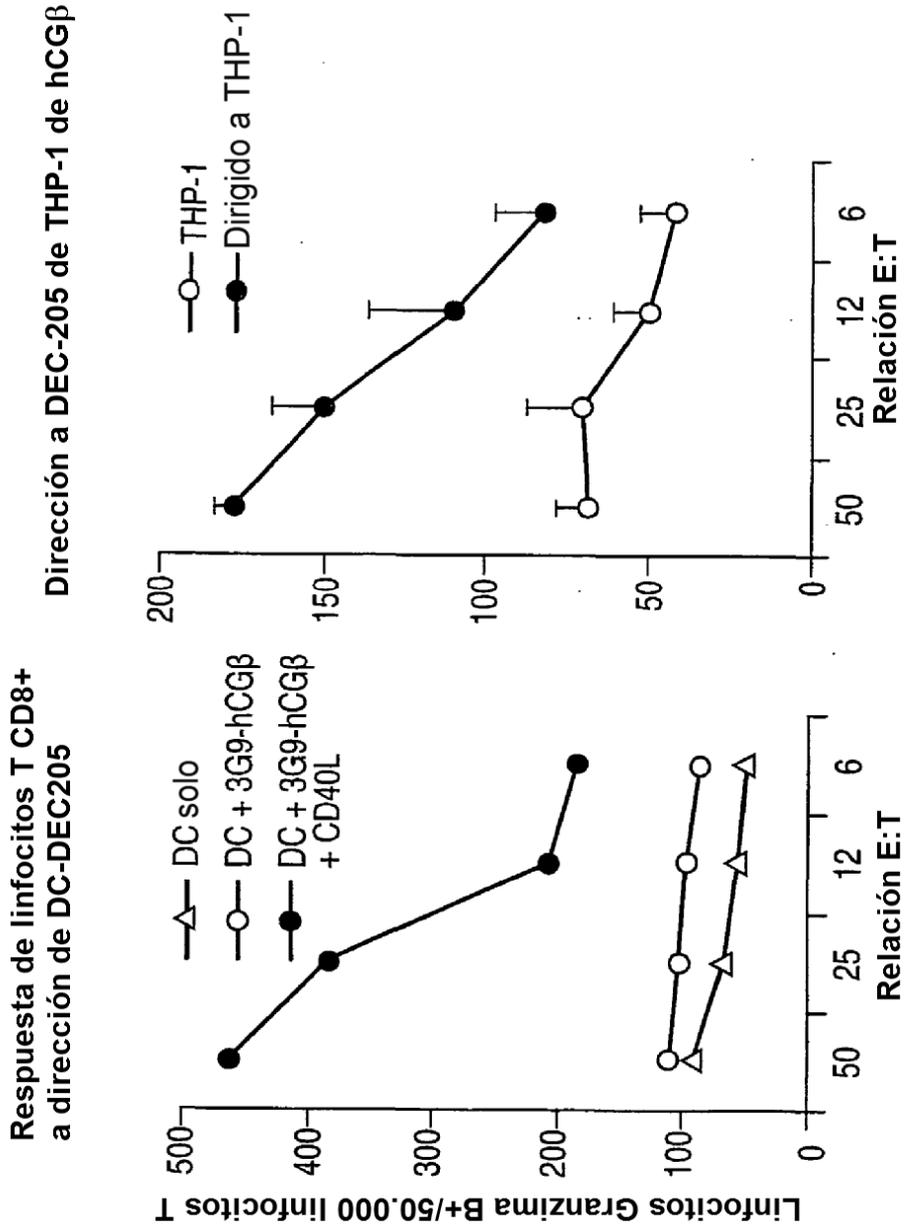


Fig. 9A

DEC-205 es funcional en linfocitos B

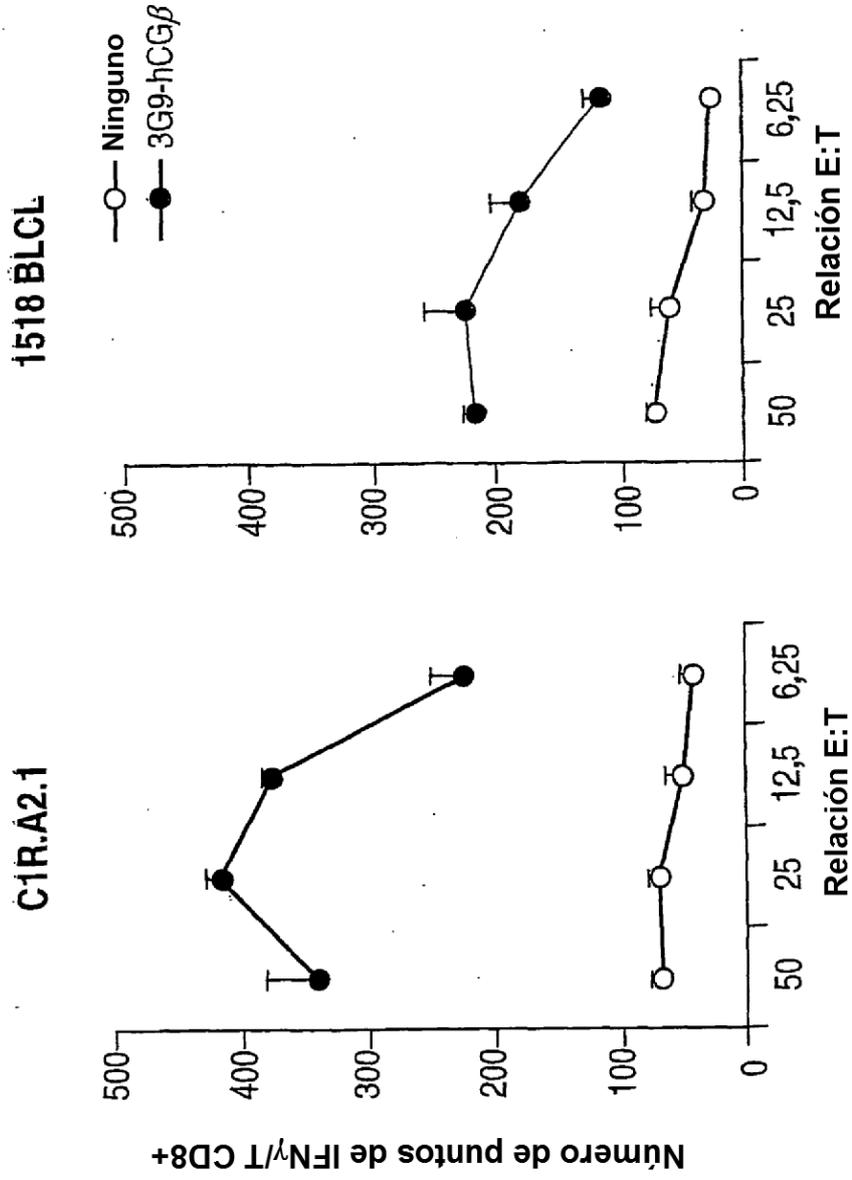


Fig. 9B