

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 517**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2006 E 06788565 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1912675**

54 Título: **Reducción de células b mediante el uso de moléculas de unión específica a cd37 y de unión específica a cd20**

30 Prioridad:

25.07.2005 US 702499 P
16.05.2006 US 800595 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.05.2014

73 Titular/es:

**EMERGENT PRODUCT DEVELOPMENT
SEATTLE, LLC (100.0%)
2401 Fourth Avenue, Suite 1050
Seattle, Washington 98121, US**

72 Inventor/es:

**GROSMAIRE, LAURA, SUE;
HAYDEN-LEDBETTER, MARTHA, SUSAN;
LEDBETTER, JEFFREY, A.;
THOMPSON, PETER, ARMSTRONG;
SIMON, SANDY, ALEXANDER y
BRADY, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 460 517 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

Reducción de células b mediante el uso de moléculas de unión específica a cd37 y de unión específica a cd20

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención proporciona de forma general el uso de moléculas de unión específica a CD37 en métodos para la reducción de células B en un individuo. En particular, la invención proporciona el uso de moléculas de unión específica a CD37 en combinación con moléculas de unión específica a CD20, en algunos casos en una combinación sinérgica, en métodos para la reducción de células B. La invención proporciona además materiales y su uso en métodos para el tratamiento de actividad aberrante de células B.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

- 10 En su función habitual, el sistema inmunitario humano protege al cuerpo frente al daño producido por sustancias extrañas y patógenos. Un modo en el que sistema inmunitario protege al cuerpo es a través de la producción de células especializadas denominadas linfocitos B o células B. Las células B producen anticuerpos que se unen a una sustancia extraña o patógeno, y en algunos casos intervienen en su destrucción.

- 15 Sin embargo, en algunos casos el sistema inmunitario humano y específicamente los linfocitos B del sistema inmunitario humano actúan de manera desviada dando como resultado enfermedades. Existen numerosos cánceres que implican una proliferación incontrolada de células B. También existen numerosas enfermedades autoinmunes que implican la producción de células B de anticuerpos que, en lugar de unirse a sustancias extrañas y patógenos, se unen a partes del cuerpo. A veces dichos anticuerpos se denominan autoanticuerpos. Adicionalmente, existen numerosas enfermedades autoinmunes e inflamatorias que implican células B en su patología, por ejemplo, a través
20 de una presentación inapropiada de antígeno de célula B a células T, o a través de otros mecanismos que implican células B. Por ejemplo, los ratones propensos a autoinmunidad deficientes en células B no desarrollan enfermedad renal autoinmune, vasculitis o autoanticuerpos. Véase Shlomchik et al., J Exp. Med., 180: 1295-306 (1994). De forma interesante, estos mismos ratones propensos a autoinmunidad que poseen células B pero son deficientes en producción de inmunoglobulina, sí desarrollan enfermedades autoinmunes cuando son inducidos
25 experimentalmente, tal como describen Chan et al., J Exp. Med., 189: 1639-48 (1999), lo que indica que las células B desempeñan una función integral en el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

- Las células B pueden ser identificadas por las moléculas de su superficie celular. La CD20 fue la primera molécula superficial específica de linaje de células B humanas identificada por un anticuerpo monoclonal. Se trata de una fosoproteína de membrana de célula B no glicosilada, hidrófoba, de 35 kDa, que tiene ambos extremos, el
30 amino y el carboxi, situados en el interior de la célula. Véase, Einfeld et al., EMBO J., 7: 711-17 (1998). La CD20 es expresada por todas las células B maduras normales, pero no es expresada por células B precursoras o células plasmáticas. Los ligandos naturales de la CD20 no han sido identificados, y la función de la CD20 en la biología de las células B sigue sin entenderse completamente.

- Otra molécula superficial específica de linaje de células B es la CD37. La CD37 es una proteína de 40-52 kDa fuertemente glicosilada que pertenece a la familia transmembrana de tetraspanina de antígenos de superficie celular. Atraviesa la membrana celular cuatro veces formando dos bucles extracelulares y exponiendo sus extremos amino y carboxi al citoplasma. La CD37 es altamente expresada en células B (slg+) productoras de anticuerpos normales, pero no es expresada en pre-células B o en células plasmáticas. La expresión de CD37 en células T, monocitos y granulocitos, activados y en reposo, es baja y no existe una expresión detectable de CD37 en células
40 NK, plaquetas o eritrocitos. Véase, Belov et al., Cancer Res., 61 (11): 4483-4489 (2001); Schwartz-Albiez et al., J. Immunol., 140(3): 905-914 (1988); y Link et al., J. Immunol., 137(9): 3013-3018 (1988). Además de las células B normales, casi todas las malignidades con origen en células B son positivas para la expresión de CD37, incluyendo CLL, NHL y leucemia de células pilosas [Moore et al., Journal of Pathology, 152: 13-21 (1987); Merson y Brochier, Immunology Letters, 19: 269-272 (1988); y Faure et al., American Journal of Dermatopathology, 12 (3): 122-133 (1990)]. La CD37 participa en la regulación de la función de las células B, ya que se observó que ratones que carecían de CD37 presentaban niveles bajos de IgG1 en suero y estaban afectados en su respuesta humoral a antígenos víricos y antígenos modelo. Parece actuar como una molécula co-estimulante no clásica o influyendo directamente en la presentación a antígeno a través de la formación de un complejo con moléculas MHC de clase II. Véase Knobloch et al., Mol. Cell. Biol., 20(15): 5363-5369 (2000). La CD37 también parece desempeñar una
50 función en la señalización de TCR. Véase Van Spriel et al., J. Immunol., 172: 2953-2961 (2004).

- La investigación y el desarrollo de fármacos se ha producido en base al concepto de que las moléculas de superficie celular específicas de linaje de células B, tales como CD37 y CD20, pueden a su vez constituir dianas para anticuerpos que se unirían a células B causantes de enfermedades autoinmunes o cancerosas que presenten CD37 o CD20 en sus superficies, y mediarían en su destrucción. Considerado como "inmunoterapia", se administró a un
55 paciente anticuerpos preparados (o basados en anticuerpos preparados) en un animal no humano que se unen a CD37 o CD20 para agotar células B causantes de enfermedad autoinmune o cancerosa.

Un anticuerpo de CD37 ha sido marcado con ¹³¹I y evaluado en ensayos clínicos para terapia de NHL. Véase Press et al., J. Clin. Oncol., 7(3): 1027-1038 (1989); Bernstein et al., Cancer Res. (Supl.), 50: 1017-1021 (1990); Press et

al., *Front. Radiat. Ther. Oncol.*, 24: 204-213 (1990); Press et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 303: 91-96 (1991) y Brown et al., *Nucl. Med. Biol.*, 24: 657-663 (1997). El anticuerpo, MB-1, es un anticuerpo monoclonal de IgG1 murino que carece de funciones efectoras Fc tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, del inglés "antibody-dependent cellular cytotoxicity") y el MB-1 no inhibió el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto *in vivo* a menos que hubiera sido marcado con un isótopo (Buchsbaum et al., *Cancer Res.*, 52(83): 6476-6481 (1992). Se observó una biodistribución favorable de ¹³¹I-MB-1 en pacientes de linfoma que presentaban cargas tumorales menores (< 1 kg) y la terapia en dichos pacientes produjo remisiones totales de tumor que duraron entre 4 y 11 meses (Press et al., 1989 y Bernstein et al. 1990).

Adicionalmente, se ha evaluado en ratones un inmunoc conjugado compuesto por el fármaco adriamicina ligado a G28-1, otro anticuerpo anti-CD37, y ha demostrado efectos por medio de la internalización y la liberación intracelular del fármaco. Véase Braslawsky et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 33(6): 367-374 (1991).

Varios grupos han investigado el uso de anticuerpo anti-CD20 para tratar enfermedades relacionadas con células B. Un tratamiento consiste en anticuerpos anti-CD20 preparados en la forma de radionucleidos para tratar linfoma de células B (p.ej., anticuerpo anti-CD20 marcado con ¹³¹I), así como una forma marcada con ⁸⁹Sr para paliar el dolor óseo provocado por metástasis de cáncer de próstata y de mama [Endo, *Gan To Kagaku Ryoho*, 26: 744-748 (1999)].

Otro grupo desarrolló un anticuerpo monoclonal quimérico específico para CD20, que consistía en regiones variables de cadena pesada y ligera de origen murino fusionadas a regiones constantes de cadena pesada de IgG1 humana y de cadena ligera kappa humana. Se publicó que el anticuerpo quimérico retenía la capacidad de unirse a CD20 y la capacidad de mediar en ADCC y fijar complemento. Véase, Liu et al., *J. Immunol.* 139: 3521-26 (1987). Otro anticuerpo anti-CD20 quimérico adicional fue preparado a partir de hibridoma C2B8 IDEC y se denominó rituximab. Se piensa que el mecanismo de actividad antitumoral del rituximab es una combinación de varias actividades, que incluyen ADCC, fijación de complemento y activación de señales que promuevan la apoptosis en células B malignas, aunque el gran tamaño del anticuerpo quimérico impide una difusión óptima de la molécula en tejidos linfoides que contengan células B malignas, limitando con ello su actividad antitumoral. La ADCC es una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcRs) (p.ej., células asesinas naturales (NK, del inglés "Natural Killer", neutrófilos y macrófagos) reconocen al anticuerpo ligado sobre una célula diana y a continuación provocan la lisis de la célula diana. La fijación de complemento, o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), es la capacidad de una molécula para lisar una diana en presencia de complemento. El mecanismo de activación de complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (p.ej. un anticuerpo) acomplejado con un antígeno semejante. El tamaño grande del rituximab impide una difusión óptima de la molécula en los tejidos linfoides que contienen células B malignas, limitando de este modo su actividad antitumoral.

El rituximab, administrado típicamente en infusiones 4 veces por semana, se usa actualmente para tratar linfoma no de Hodgkin de célula B folicular [McLaughlin et al., *Oncology*, 12: 1763-1777 (1998); Leget et al., *Curr. Opin. Oncol.*, 10: 548-551 (1998)] y en linfoma folicular de estadio III/IV de recaída [White et al., *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2: 95-101 (1999)]. Otros trastornos tratables con rituximab incluyen el linfoma de célula de centro folicular (FCC), el linfoma de célula manta (MCL), el linfoma de célula grande difusa (DLCL) y el linfoma linfocítico pequeño (SLL) [Nguyen et al., *Eur J Haematol.*, 62: 76-82 (1999)]. El rituximab administrado en infusiones semanales también se usa para tratar CLL [Lin et al., *Sem Oncol.*, 30: 483-92 (2003)].

También se han usado anticuerpos anti-CD20 para tratar pacientes que padecen enfermedades autoinmunes asociadas a la producción celular de autoanticuerpos. Por ejemplo, el rituximab ha demostrado un beneficio clínico significativo en el agotamiento de células B CD20+ en pacientes con múltiples enfermedades autoinmunes/antiinflamatorias que incluyen la AR [Edwards, *N Engl J Med.*, 350: 2546-2548 (2004); Cambridge et al., *Arthritis Rheum.*, 48: 2146-54 (2003)]. Los pacientes de AR recibieron dosis continuadas de metotrexato (MTX) y un curso de 4 dosis de infusión de rituximab (Edwards, ver anterior). Dichos pacientes mostraron una mejora en las respuestas del "American College of Rheumatology" (ACR) en comparación con grupos de control.

En un ensayo para el tratamiento de lupus sistémico eritematoso (LSE) [Leandro et al., *Arthritis Rheum.*, 46: 2673-2677 (2002)], se administró a los pacientes dos infusiones de dosis alta de rituximab, y se demostró una reducción de células B y una mejoría en el estado de la enfermedad. En un segundo estudio de reducción de células B en LSE [Looney et al., *Arthritis Rheum.*, 50: 2580-2589 (2004)], se administró a los pacientes una infusión única de 100 mg/m² de rituximab (dosis baja), una infusión única de 375 mg/m² de rituximab (dosis intermedia) o 4 infusiones (con 1 semana de separación) de 375 mg/m² de rituximab (dosis alta). Dichos pacientes mostraron una reducción de células B y una mejoría en las puntuaciones de enfermedad, pero el tratamiento no alteró el nivel de autoanticuerpos. También se han llevado a cabo ensayos de rituximab en macroglobulinemia de Waldenström [Treon et al., *Immunother.*, 24: 272-279 (2000)], en los que los pacientes mostraron un aumento de los recuentos de hematocrito (HCT) y plaquetas (PLT) después de 4 infusiones de rituximab.

Informes recientes de tratamientos con rituximab en pacientes que padecen esclerosis múltiple, una enfermedad autoinmune que afecta al sistema nervioso central, indican que un curso de tratamiento agota células B periféricas

pero tiene poco efecto sobre células B del fluido cerebrospinal. Véase Monson et al., Arch. Neurol., 62: 258-264 (2005).

Otras publicaciones adicionales relacionadas con el uso de rituximab incluyen: Stashi et al. "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura" Blood 98: 952-957 (2001); Matthews, R. "Medical Heretics" New Scientist (7 de abril, 2001); Leandro et al. "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" Ann Rheum Dis 61: 833-888 (2002); Leandro et al. "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response" Arthritis and Rheumatism 44(9): S370 (2001); Leandro et al. "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", Arthritis Rheum. 46: 2673-2677 (2002); Edwards et al., "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" Rheumatology 40: 205-211 (2001); Edwards et al. "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" Biochem. Soc. Trans. 30(4): 824-828 (2002); Edwards et al. "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis", Arthritis Rheum. 46: S197 (2002); Levine et al., "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab" Neurology 52: 1701-1704 (1999); DeVita et al. "Efficacy of selective B-cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" Arthritis Rheum 46: 2029-2033 (2002); Hidashida et al. "Treatment of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with rituximab". Presentado en la Reunión Científica Anual del "American College of Rheumatology"; octubre 24-29; Nueva Orleans, La. 2002; Tuscano, J. "Successful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab". Presentado en la Reunión Científica Anual del "American College of Rheumatology"; octubre 24-29; Nueva Orleans, La. 2002.

Sigue habiendo problemas asociados a la terapia con rituximab. Por ejemplo, la mayoría de los pacientes de cáncer tratados con rituximab recaen, generalmente en aproximadamente 6-12 meses, y se han reportado reacciones fatales a la infusión en las 24 horas posteriores a la infusión de rituximab. Estas reacciones fatales siguieron un complejo de reacción a infusión que incluía hipoxia, infiltraciones pulmonares, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, infarto de miocardio, fibrilación ventricular o choque cardiogénico. También se ha reportado fallo renal agudo que requiere diálisis con casos de resultado fatal al producirse síndrome de lisis tumoral después de un tratamiento con rituximab, así como reacciones mucocutáneas severas, algunas con resultado fatal. Adicionalmente, se requieren dosis elevadas de rituximab para inyección intravenosa, ya que esta molécula es grande, aproximadamente de 150 kDa, y, como se ha indicado antes, la difusión en los tejidos linfoides en los que residen muchas células tumorales es limitada.

Debido a que las células B maduras normales también expresan CD37 y CD20, las células B normales también se ven agotadas por terapias de anticuerpos anti-CD37 (Press et al., 1989) o anti-CD20 [Reff et al., Blood, 83: 435-445 (1994)]. Una vez completado el tratamiento, no obstante, las células B normales pueden regenerarse a partir de precursores de células B negativos en CD37 y CD20; por lo tanto, los pacientes tratados con terapia anti-CD37 o anti-CD20 no experimentan una inmunosupresión significativa.

La tecnología de anticuerpos monoclonales y los métodos de ingeniería genética han conducido al desarrollo de moléculas de inmunoglobulina para diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas. Se ha aplicado ingeniería de proteínas para mejorar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno semejante, para reducir los problemas relacionados a inmunogenicidad, y para alterar las funciones efectoras de un anticuerpo. El dominio estructural de las inmunoglobulinas es susceptible de ingeniería, en el sentido en que los dominios de unión a antígeno y los dominios que confieren las funciones efectoras pueden ser intercambiados entre clases y subclases de inmunoglobulinas. La estructura y la función de la inmunoglobulina se revisan, por ejemplo, en Harlow et al., Eds., "Antibodies: A Laboratory Manual", Capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988). En el libro de texto "Recombinant Antibodies" (John Wiley & Sons, NY, 1999) se puede encontrar una extensa introducción, así como información detallada sobre todos los aspectos de la tecnología de anticuerpos recombinantes. En R. Kontermann y S. Dübel (eds.), "The Antibody Engineering Lab Manual" (Springer Verlag, Heidelberg/Nueva York, 2000) se puede encontrar una colección completa de protocolos de laboratorio de ingeniería de anticuerpos detallados.

Recientemente, se han construido moléculas de inmunoglobulina más pequeñas para solventar los problemas asociados a toda la terapia de inmunoglobulinas. El Fv de cadena individual (scFv) comprende un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo unido a través de un ligando peptídico corto a un dominio de variable de cadena ligera de anticuerpo [Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)]. Además de las regiones variables, todas las cadenas de anticuerpo tienen una o más regiones constantes. Las cadenas ligeras tienen un único dominio de región constante. Por tanto, las cadenas ligeras tienen una región variable y una región constante. Las cadenas pesadas tienen varios dominios de región constante. Las cadenas pesadas de los anticuerpos IgG, IgA y IgD tienen tres dominios de región constante, que se designan CH1, CH2 y CH3, y las cadenas pesadas de los anticuerpos IgM e IgE tienen cuatro dominios de región constante, CH1, CH2, CH3 and CH4. Por tanto, las cadenas pesadas tienen una región variable y tres o cuatro regiones constantes.

Las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas también pueden dividirse en tres regiones funcionales: la región Fd (un fragmento que comprende V.sub.H y CH1, es decir, los dos dominios N-terminales de la cadena pesada), la región de bisagra y la región Fc (la región de "fragmento cristalizante", derivada de regiones constantes y formada

tras una digestión de pepsina). La región Fd en combinación con la cadena ligera forma un Fab (el "fragmento de unión a antígeno"). Puesto que un antígeno reacciona estereoquímicamente con la región de unión a antígeno del extremo amino de cada Fab, la molécula de IgG es divalente, es decir, puede unirse a dos moléculas de antígeno. El Fc contiene los dominios que interaccionan con los receptores de inmunoglobulina sobre las células y con los elementos iniciales de la cascada de complemento. Por tanto, el fragmento Fc se considera de forma general responsable de las funciones efectoras de una inmunoglobulina, tal como la fijación de complemento y la unión a receptores de Fc.

Debido al pequeño tamaño de las moléculas de scFv, éstas exhiben una eliminación muy rápida del plasma y de los tejidos y una penetración más efectiva en tejidos que la inmunoglobulina completa. Un scFv antitumoral mostró una penetración tumoral más rápida y una distribución más uniforme por la masa del tumor que el correspondiente anticuerpo quimérico [Yokota et al., *Cancer Res.*, 52, 3402-3408 (1992)]. La fusión de un scFv a otra molécula, tal como una toxina, aprovecha la actividad específica de antígeno y el tamaño pequeño de un scFv para conducir la toxina a un tejido diana. [Chaudary et al., *Nature*, 339: 394 (1989); Batra et al., *Mol. Cell. Biol.*; 11: 2200 (1991)].

A pesar de las ventajas de las moléculas de scFv, en su uso existen varias desventajas. Aunque una eliminación rápida de scFv puede reducir los efectos tóxicos en células normales, dicha eliminación rápida puede prevenir la llegada de una dosis mínima efectiva al tejido diana. La fabricación de cantidades adecuadas de scFv para administración a pacientes ha sido un reto debido a las dificultades en la expresión y el aislamiento de scFv, que afectan negativamente al rendimiento. Durante la expresión, las moléculas de scFv carecen de estabilidad y a menudo se agregan debido a emparejamiento de regiones variables de diferentes moléculas. Además, los niveles de producción de moléculas de scFv en sistemas de expresión de mamífero son bajos, limitando el potencial para una fabricación eficiente de moléculas de scFv para terapia [Davis et al., *J Biol. Chem.*, 265: 10410-10418 (1990); Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991). Se han explorado estrategias para mejorar la producción, incluyendo la adición de sitios de glicosilación a las regiones variables [Jost, C. R. Patente de EE.UU. N° 5.888.773, Jost et al., *J. Biol. Chem.*, 69: 26267-26273 (1994)].

Otra desventaja de usar scFv para terapia es la falta de función efectora. Un scFv sin las funciones citolíticas, ADCC y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), asociadas a la región constante de una inmunoglobulina, puede ser ineficaz para tratar una enfermedad. Incluso aunque el desarrollo de la tecnología de scFv comenzó hace 12 años, en la actualidad no se aprobado para terapia ningún producto de scFv.

Alternativamente, se ha propuesto que la fusión de un scFv y otra molécula, tal como una toxina, podría aprovechar la actividad específica de unión a antígeno y el tamaño pequeño de un scFv para conducir la toxina a un tejido diana. Chaudary et al., *Nature* 339: 394 (1989); Batra et al., *Mol. Cell. Biol.* 11: 2200 (1991). Por tanto, la conjugación o la fusión de toxinas a scFvs se ha planteado como estrategia alternativa para proporcionar moléculas potentes específicas de antígeno, pero la dosificación de dichos conjugados o quimeras puede estar limitada por una toxicidad excesiva y/o no específica debido a la función de toxina de dichas preparaciones. Los efectos tóxicos pueden incluir elevación suprafisiológica de enzimas hepáticas y síndrome de pérdidas vasculares, y otros efectos no deseados. Adicionalmente, las inmunotoxinas son en sí mismas altamente inmunogénicas cuando se administran a un hospedante, y los anticuerpos del hospedante generados contra dicha inmunotoxina limitan su utilidad potencial en tratamientos terapéuticos repetidos en un individuo.

Otras proteínas de fusión diseñadas por ingeniería, denominadas productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP™, del inglés "Small Modular Immunopharmaceutical"), se describen en las Publicaciones de Patente de EE.UU. compartidas 2003/133939, 2003/0118592 y 2005/0136049, y en las Publicaciones de Patente Internacional compartidas WO02/056910, WO2005/037989 y WO2005/017148. Los productos SMIP son nuevas proteínas de fusión inmunoglobulina-dominio de unión que presentan un dominio de unión para una estructura semejante tal como un antígeno, un contrarreceptor o similar; un polipéptido de región de bisagra de IgG1, IGA o IgE, o un polipéptido de región de bisagra de IgG1 mutante que tiene cero, uno o dos residuos de cisteína; y dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3. Los productos SMIP tienen capacidad de ADCC y/o CDC.

Aunque se ha realizado una intensa investigación con terapias basadas en anticuerpos, sigue existiendo una necesidad en la técnica de métodos mejorados para tratar enfermedades con actividad aberrante de células B. Los usos de la presente invención descritos y reivindicados en la presente memoria proporcionan dichos usos mejorados, así como otras ventajas.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de unión específica a CD37 humanizada para uso en el tratamiento de cáncer o de una enfermedad autoinmune de células B, donde la proteína de unión específica a CD37 humanizada comprende:

(a) regiones estructurales de cadena ligera humana, una cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, una cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, y una cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y

(b) regiones estructurales de cadena pesada humana, una cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, una cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 65, y una cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ó 68, que se caracteriza porque la proteína de unión específica a CD37 humanizada debe usarse en combinación con una proteína de unión específica a CD20.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de unión específica a CD20 para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B que se caracteriza porque la proteína de unión específica a CD20 debe usarse en combinación con una proteína de unión específica a CD37 humanizada para uso en el tratamiento de un cáncer o enfermedad autoinmune de células B, donde la proteína de unión específica a CD37 humanizada comprende:

(a) regiones estructurales de cadena ligera humana, una cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, una cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, y una cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y

(b) regiones estructurales de cadena pesada humana, una cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, una cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, y una cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ó 68.

En un tercer aspecto, se proporciona un artículo de fabricación que comprende una proteína de unión específica a CD20 y una proteína de unión específica a CD37 humanizada para uso en el tratamiento de un cáncer o enfermedad autoinmune de células B, donde la proteína de unión específica a CD37 humanizada comprende:

(a) regiones estructurales de cadena ligera humana, una cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, una cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, y una cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y

(b) regiones estructurales de cadena pesada humana, una cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, una cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, y una cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ó 68.

Preferiblemente, en todos los aspectos de la invención, las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de la proteína de unión específica a CD37 humanizada consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 61, 64 y 66, respectivamente; y

donde las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 63, 65 y 67, respectivamente.

Preferiblemente, en todos los aspectos de la invención, las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de la proteína de unión específica a CD37 humanizada consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 61, 64 y 66, respectivamente; y

donde las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 63, 65 y 68, respectivamente.

Preferiblemente, en todos los aspectos de la invención, la región estructural de cadena ligera humana se selecciona de las SEQ ID NOS: 170-172, 175, 179, 182, 184-188, 191, 194-198, 203 y 205-210; o

la región estructural de cadena pesada humana se selecciona de las SEQ ID NOS: 140, 141, 143-147, 150, 151, 154-163, 168 y 169.

Preferiblemente, en todos los aspectos de la invención, la primera región estructural de cadena ligera humana (FR1) se selecciona de las SEQ ID NOS: 170-172, 175 y 177-181; la FR2 humana de la región estructural de cadena ligera se selecciona de las SEQ ID NOS: 182, 184-188 y 191; la FR3 humana de la cadena ligera se selecciona de las SEQ ID NOS: 194-198, 203 y 205; y la FR4 humana de la cadena ligera se selecciona de las SEQ ID NOS: 206-210; o

la primera región estructural de cadena pesada humana (FR1) se selecciona de las SEQ ID NOS: 140, 141 y 143-146; la FR2 humana de la cadena pesada se selecciona de las SEQ ID NOS: 147, 150 y 151; la FR3 humana de la cadena pesada se selecciona de las SEQ ID NOS: 154-160; y la FR4 humana de la cadena pesada se selecciona de las SEQ ID NOS: 161-163, 168 y 169.

Preferiblemente, en todos los aspectos de la invención, la proteína de unión comprende un polipéptido Fv de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo o un fragmento de unión al mismo, o una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende, desde el extremo amino al carboxi, (i) un dominio de unión que tenga regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina separadas por un péptido de enlace, (ii) un polipéptido de región de bisagra de inmunoglobulina que tenga cero, uno o dos residuos de cisteína, y (iii) dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina. De manera aún más preferible, el polipéptido de región de bisagra de inmunoglobulina puede ser un polipéptido de

región de bisagra de IgG1, IgGA o IgE o un mutante de IgG1. De forma ventajosa, la proteína de unión es una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada;

5 la región variable de cadena ligera está unida a la región variable de cadena pesada mediante un péptido de unión que comprende (Gly4SER)_n, donde n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6; y

las regiones variables de cadena ligera y pesada unidas están conectadas a un dominio efector IgG1 a través de una bisagra compuesta por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 115, 116, 118, 120, 122, 124, 126 ó 127.

10 Preferiblemente, en todos los aspectos de la invención, la proteína de unión específica a CD37 humanizada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 48 y 52.

Preferiblemente, en todos los aspectos de la invención, la proteína de unión específica a CD20 es un anticuerpo monoclonal específico de CD20, preferiblemente Rituximab.

15 De forma ventajosa, en todos los aspectos de la invención, la proteína de unión específica a CD20 es una proteína de fusión de inmunoglobulina que es específica de CD20 y que comprende, desde el extremo amino al carboxi, (i) un dominio de unión que tenga regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina separadas por un péptido de enlace, (ii) un polipéptido de región de bisagra de inmunoglobulina que tenga cero, uno o dos residuos de cisteína, y (iii) dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina. De manera aún más preferible, el polipéptido de región de bisagra de inmunoglobulina puede ser un polipéptido de región de bisagra de IgG1, IgGA o IgE o un mutante de IgG1.

20 Preferiblemente, en todos los aspectos de la invención, el método comprende además el uso de un agente quimioterapéutico, una citocina, una quimiocina o un factor de crecimiento.

25 Preferiblemente, en todos los aspectos de la invención, el cáncer de células B es enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfomas del sistema nervioso central, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, leucemia mioblástica crónica, mieloma múltiple, linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal esplénica, mieloma de célula plasmática, plasmacitoma solitario de hueso, plasmacitoma extraóseo, linfoma de células B de zona marginal extra-nodal de tejido linfoide asociado a mucosa, linfoma de células B de zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de células manta, linfoma de células B grandes difusas, linfoma de células B grandes mediastinales (tímicas), linfoma de células B grande intravascular, linfoma de efusión primaria, linfoma/leucemia de Burkitt, proliferaciones de células B de potencial maligno incierto, granulomatosis linfomatoide o trastorno linfoproliferativo post-trasplante.

De forma ventajosa, en todos los aspectos de la invención la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritomatoso, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjogren, enfermedad de Grave, diabetes mellitus de tipo I, soriasis, púrpura trombocitopénica inmune, pénfigo, miopatía inflamatoria idiopática, miastenia gravis o macroglobulinemia de Waldenstrom.

35 Preferiblemente, en todos los aspectos de la invención, la proteína de unión específica a CD37 y la proteína de unión específica a CD20 se administran secuencialmente en un periodo aproximado de 24 horas o se administran simultáneamente.

40 En algunos usos de la invención, el uso de combinaciones de moléculas de unión específica a CD37 (una o más moléculas de unión específica a CD37) y moléculas de unión específica a CD20 (una o más moléculas de unión específica a CD20) da como resultado un aumento de la reducción de células B. En algunos de dichos métodos, las combinaciones son sinérgicas. En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para tratar un individuo que padece, o que se sospecha que padece, una enfermedad asociada a actividad aberrante de células B.

45 La presente descripción también proporciona moléculas de unión específica a CD37 humanizada (p.ej. construcciones TRU-016 humanizadas) y métodos para reducir células B usando dichas moléculas. En algunas realizaciones de los usos de la invención, se contemplan los usos de combinaciones de construcciones TRU-016 humanizadas con una o más moléculas de unión específica a CD20. En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para tratar individuos que padecen, o que se sospecha que padecen, una enfermedad asociada a actividad aberrante de células B. Aspectos relacionados de la descripción se dedican a métodos de prevención de cualquier enfermedad de este tipo y a métodos paliativos de síntomas asociados a enfermedades de este tipo que comprenden la administración de una dosis de una molécula de unión específica a CD37 humanizada efectiva para tratar o prevenir dicha enfermedad, o para aliviar un síntoma de dicha enfermedad.

50 "Actividad aberrante de células B" se refiere a actividad de células B que se desvía respecto al curso normal, apropiado o esperado. Por ejemplo, la actividad aberrante de células B puede incluir una proliferación inapropiada de células cuyo ADN u otros componentes han quedado dañados o defectuosos. La actividad aberrante de células B puede incluir la proliferación celular cuyas características están asociadas a una enfermedad que está provocada, mediada o que es el resultado de niveles inapropiadamente elevados de división celular, niveles apropiadamente

bajos de apoptosis o ambos. Dichas enfermedades pueden caracterizarse, por ejemplo, por proliferaciones anormales locales simples o múltiples de células, grupos de células o tejido(s), tanto cancerosos como no cancerosos, benignos o malignos. La actividad aberrante de células B puede incluir también la producción aberrante de anticuerpos, tal como la producción de autoanticuerpos, o la sobreproducción de anticuerpos típicamente deseables cuando se producen a niveles normales. Se contempla que la actividad aberrante de células B pueda producirse en determinadas subpoblaciones de células B y no en otras subpoblaciones. La actividad aberrante de células B también puede incluir la estimulación inapropiada de células T, tal como por presentación de antígeno de célula B inapropiada a células T o por otros mecanismos que impliquen células B.

"Tratamiento" o "tratar" se refieren a un tratamiento terapéutico o a un tratamiento profiláctico/preventivo. Un tratamiento terapéutico puede mejorar al menos un síntoma en un individuo que recibe el tratamiento o puede retrasar el empeoramiento de una enfermedad progresiva en un individuo, o prevenir el inicio de otras enfermedades asociadas.

Una "dosis terapéuticamente efectiva" o "dosis efectiva" de una molécula de unión específica a CD20 se refiere a la cantidad de compuesto que es suficiente para dar como resultado el alivio de uno o más síntomas de la enfermedad tratada. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a dicho ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, cuando se administran en serie o simultáneamente. La invención contempla específicamente que una o más moléculas de unión específica se puedan administrar de acuerdo a los usos de la invención, cada una en una dosis efectiva.

"Un individuo que padece, o que se sospecha que padece, una enfermedad asociada a actividad aberrante de células B" es un individuo en el que una enfermedad o síntoma pueden estar causados por actividad aberrante de células B, pueden estar exacerbados por actividad aberrante de células B, o pueden aliviarse mediante regulación de la actividad de células B. Los ejemplos de dichas enfermedades son un cáncer de células B (por ejemplo, linfoma de células B, una leucemia de células B o un mieloma de células B), una enfermedad que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos o una enfermedad que se caracteriza por una estimulación inapropiada de células T causada por una presentación inapropiada de antígeno de células B a células T o causada por otros mecanismos que impliquen células B.

En un ejemplo de aspecto, un individuo tratado mediante los métodos de la descripción demuestra una respuesta al tratamiento que es mejor que la respuesta al tratamiento con rituximab, o que se ve mejorada con respecto a ella. Una respuesta que es mejorada con respecto al tratamiento con rituximab se refiere a una respuesta clínica en la que el tratamiento mediante un método de la descripción da como resultado una respuesta clínica en un paciente que es mejor que una respuesta clínica en un paciente que recibe terapia de rituximab, tal como rituximab. Una respuesta mejorada se determina por comparación de criterios clínicos bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. Los ejemplos de criterios incluyen, aunque sin limitación, la duración del agotamiento de células B, la reducción del recuento de células B en una muestra biológica, la reducción del tamaño del tumor, la reducción del número de tumores existentes y/o que aparecen después del tratamiento, y la respuesta general mejorada determinada por los propios pacientes y médicos, p.ej., usando un Índice Prognóstico Internacional. La mejoría puede ser en uno o más de los criterios clínicos. Una respuesta mejorada con el método de la invención puede ser debida a una respuesta inadecuada al tratamiento previo o actual con rituximab, por ejemplo, a causa de la toxicidad y/o eficacia inadecuada del tratamiento con rituximab.

Los cánceres de células B incluyen linfomas de células B [tal como varias formas de la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no de Hodgkin (NHL) o los linfomas del sistema nervioso central], leucemias [tal como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas y leucemia mioblástica crónica] y mielomas (tal como mieloma múltiple). Otros cánceres de células B incluyen linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal esplénica, mieloma de célula plasmática, plasmacitoma solitario de hueso, plasmacitoma extraóseo, linfoma de células B de zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), linfoma de células B de zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de célula de manta, linfoma de células B grande difuso, linfoma de células B mediastinal (tímico), linfoma de células B intravascular, linfomas de efusión primaria, linfoma/leucemia de Burkitt, proliferaciones de células B de potencial maligno incierto, granulomatosis linfomatoide y trastorno linfoproliferativo post-trasplante.

Los trastornos caracterizados por producción de autoanticuerpos a menudo se consideran enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes incluyen, aunque sin limitación: artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, policondritis, artritis psoriática, psoriasis, dermatitis, polimiositis/dermatomiositis, miositis corporal de inclusión, miositis inflamatoria, necrosis epidérmica tóxica, escleroderma y esclerosis sistémicos, síndrome de CREST, respuestas asociadas a enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome de insuficiencia respiratoria, síndrome de insuficiencia respiratoria adulta (ARDS), meningitis, encefalitis, uveítis, colitis, glomerulonefritis, afecciones alérgicas, eczema, asma, afecciones que implican infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus sistémico eritematoso (SLE), lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus discoide, lupus mielitis, lupus cerebritis, diabetes de inicio juvenil, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica, neuromielitis

óptica, fiebre reumatoide, corea de Sydenham, respuestas inmunes asociadas hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis que incluye granulomatosis de Wegener y enfermedad de Churg-Strauss, agranulocitosis, vasculitis (que incluye vasculitis/angiitis de hipersensibilidad, ANCA y vasculitis reumatoide), anemia aplásica, anemia Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmune que incluye anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, aplasia de células rojas puras (PRCA), deficiencia de Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, trastornos inflamatorios de sistema nervioso central (SNC), síndrome de lesión de órganos múltiple, miastenia gravis, enfermedades mediadas por complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana de base anti-glomerular, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo de trasplante de órgano sólido, enfermedad de injerto contra hospedante (GVHD), penfigoide ampolloso, pénfigo, poliendocrinopatías autoinmunes, espondiloartropatías seronegativas, enfermedad de Reiter, síndrome de persona rígida, arteritis de célula gigante, nefritis de complejo inmune, nefropatía de IgA, polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénico idiopático (ITP), púrpura trombocitopénico trombótico (TTP), púrpura de Henoch-Schonlein, trombocitopenia autoinmune, enfermedad autoinmune de los testículos y ovarios, que incluye orquitis y ooforitis autoinmune, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunes que incluyen tiroiditis autoinmune, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), diabetes de Tipo I también denominada diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmune, neumonitis intersticial linfóide (HIV), bronquiolitis obliterans (no trasplante) contra NSIP, Síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de vaso grande (que incluye polimialgia reumática y arteritis de célula gigante (de Takayasu)), vasculitis de vaso medio (que incluye enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), espondilitis anquilosante de poliarteritis nodosa (PAN), enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), glomerulonefritis de progresión rápida, cirrosis biliar primaria, esprue celiaco (enteropatía de gluten), crioglobulinemia, crioglobulinemia asociada a hepatitis, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad arterial coronaria, fiebre Mediterránea familiar, poliangiitis microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott-Aldrich y tromboangiitis obliterans.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica que se caracteriza por la inflamación de las articulaciones, que conduce a hinchamiento, dolor y pérdida de funciones. Los pacientes que padecen AR durante un periodo de tiempo extendido habitualmente experimentan una destrucción, deformación articular progresiva e incluso una muerte prematura.

La enfermedad de Crohn y una enfermedad relacionada, la colitis ulcerativa, son las dos categorías de enfermedad principales que pertenecen a un grupo de enfermedades denominadas enfermedad inflamatoria del intestino (IBD, del inglés "inflammatory bowel disease"). La enfermedad de Crohn es un trastorno crónico que causa inflamación del tracto digestivo o gastrointestinal (GI). Aunque puede implicar cualquier área del tracto GI desde la boca al ano, lo más habitual es que afecte al intestino delgado y/o al colon. En la colitis ulcerativa, la participación del GI se limita al colon.

La enfermedad de Crohn se puede caracterizar por anticuerpos contra antígenos neutrófilos, esto es, el "anticuerpo anti-neutrófilo perinuclear" (pANCA) y *Saccharomyces cerevisiae*, esto es, el "anticuerpo anti-*Saccharomyces cerevisiae*" (ASCA). Muchos pacientes con colitis ulcerativa tienen el anticuerpo pANCA en su sangre, pero no el anticuerpo ASCA, mientras que muchos pacientes de Crohn presentan anticuerpos ASCA, y no anticuerpos pANCA. Un método para evaluar la enfermedad de Crohn es usar el Índice de Actividad de enfermedad de Crohn (CAI), basado en 18 puntuaciones de variables predictoras tomadas por médicos. Valores de CAI de 150 e inferiores se asocian a enfermedad quiescente; valores por encima indican enfermedad activa, y valores por encima de 450 se consideran enfermedad extremadamente grave [Best et al., "Development of a Crohn's disease activity index." *Gastroenterology* 70: 439-444 (1976)]. Sin embargo, desde el estudio original, algunos investigadores usan un "valor subjetivo" de 200 a 250 como puntuación saludable.

El Lupus Sistémico Eritematoso (SLE) es una enfermedad autoinmune causada por lesiones recurrentes de los vasos sanguíneos en órganos múltiples, que incluyen riñón, piel y articulaciones. En pacientes de SLE, una interacción defectuosa entre células T y células B da como resultado la producción de autoanticuerpos que atacan al núcleo de la célula. Existe un acuerdo general en que los autoanticuerpos son los responsables del SLE, por lo que nuevas terapias que agoten el linaje de células B, permitiendo que el sistema inmunitario se reinicie según se vayan generando nuevas células B a partir de precursores, ofrecerían esperanzas de beneficios de larga duración en pacientes de SLE.

La esclerosis múltiple (EM) también es una enfermedad autoinmune. Se caracteriza por la inflamación del sistema nervioso central y por la destrucción de mielina, lo que aísla fibras de células nerviosas en el cerebro, la médula espinal y el cuerpo. Aunque se desconoce la causa de la EM, está extendida la creencia de que las células T autoinmunes son contribuyentes primarios a la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, en el fluido espinal cerebral de pacientes con EM hay presentes niveles elevados de anticuerpos, y algunas teorías predicen que la respuesta de células B que conduce a producción de anticuerpos es importante para mediar en la enfermedad.

La enfermedad tiroidea autoinmune es el resultado de la producción de autoanticuerpos que estimulan la tiroides para provocar hipertiroidismo (enfermedad de Graves) o que destruyen la tiroides para provocar hipotiroidismo (tiroiditis de Hashimoto). La estimulación de la tiroides está provocada por autoanticuerpos que se unen y activan al receptor de hormona estimulante de tiroides (TSH). La destrucción de la tiroides está provocada por autoanticuerpos que reaccionan con otros antígenos de tiroides.

El síndrome de Sjogren es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las glándulas productoras de humedad del cuerpo.

La púrpura trombocitopénica inmune (ITP) está causada por autoanticuerpos que se unen a plaquetas sanguíneas y provocan su destrucción.

La miastenia Gravis (MG) es un trastorno neuromuscular autoinmune crónico que se caracteriza por autoanticuerpos que se unen a receptores de acetilcolina expresados en las uniones neuromusculares, lo que conduce a debilidad de los grupos musculares voluntarios.

La psoriasis se caracteriza por una inflamación autoinmune de la piel y también está asociada a artritis en el 30% de los casos, escleroderma, enfermedad inflamatoria del intestino, que incluye enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa,

también se contempla el tratamiento de miopatía inflamatoria idiopática (IIM), que incluye dermatomiositis (DM) y polimiositis (PM). Las miopatías inflamatorias se han clasificado en categorías usando una serie de esquemas de clasificación. El esquema de clasificación de Miller (Miller, Rheum Dis Clin North Am. 20: 811-826, 1994) identifica 2 miopatías inflamatorias idiopáticas (IIM), la polimiositis (PM) y la dermatomiositis (DM).

La polimiositis y la dermatomiositis son enfermedades inflamatorias crónicas debilitantes que afectan a los músculos y, en el caso de la DM, a la piel. Estos trastornos son raros, con una incidencia anual reportada de aproximadamente 5 a 10 casos por millón de adultos y entre 0,6 y 3,2 casos por millón de niños al año en los Estados Unidos (Targoff, Curr Probl Dermatol. 1991, 3: 131-180). La miopatía inflamatoria idiopática está asociada a una morbilidad y una mortalidad significativas, con hasta la mitad de los adultos afectados por una discapacidad significativa (Gottdiener et al., Am J Cardiol. 1978, 41: 1141-49). Miller (Rheum Dis Clin North Am. 1994, 20: 811-826 y "Arthritis and Allied Conditions", Cap. 75, Eds. Koopman y Moreland, Lippincott Williams and Wilkins, 2005) establece cinco grupos de criterios usados para diagnosticar la IIM, es decir, la determinación de Criterios de Miopatía Inflamatoria Idiopática (IIMC), que incluye debilidad muscular, evidencia de degeneración en biopsias musculares, elevación de los niveles en suero de enzimas asociadas a músculo, triada electromagnética de miopatía, evidencia de sarpullidos en dermatomiositis, e incluye también la evidencia de autoanticuerpos como criterio secundario.

Los factores asociados a IIM, que incluyen enzimas asociadas a músculo y autoanticuerpos, incluyen, aunque sin limitación, creatina quinasa (CK), lactato deshidrogenasa, aldolasa, proteína C-reactiva, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y autoanticuerpo antinuclear (ANA), anticuerpos específicos de miositis (MSA), y anticuerpos de antígenos nucleares extraíbles.

Una "molécula de unión" según la invención puede ser, por ejemplo, una proteína (una "proteína" puede ser un polipéptido o un péptido), un ácido nucleico, un carbohidrato, un lípido, o un compuesto de molécula pequeña que se une a una diana. Un tipo de molécula de unión proteínica contemplada por la invención es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que retiene la actividad de unión. Una molécula de unión se puede modificar según los métodos estandarizados en la técnica para mejorar su afinidad de unión, disminuir su inmunogenicidad, alterar sus funciones efectoras y/o mejorar su disponibilidad en el cuerpo de un individuo. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, modificaciones de secuencia de aminoácidos o expresión como una proteína de fusión. Dichas proteínas de fusión también son moléculas de unión según la invención. Un ejemplo de molécula de unión para los usos de la invención es un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP™).

Una molécula de unión que es "específica" para una diana se une a dicha diana con una afinidad mayor que a cualquier otra diana. Por ejemplo, una molécula de unión específica a CD37 se une a CD37 con una afinidad mayor que a cualquier otra diana, y una molécula de unión específica a CD20 se une a CD20 con una afinidad mayor que a cualquier otra diana. Las moléculas de unión de la invención pueden tener afinidades por sus dianas con un K_a superior o igual a aproximadamente 10^4 M^{-1} , preferiblemente superior o igual a aproximadamente 10^5 M^{-1} , más preferiblemente superior o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1} y aún más preferiblemente superior o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} . Afinidades iguales o superiores a aproximadamente 10^7 M^{-1} son aún más preferidas, tal como afinidades iguales o superiores a aproximadamente 10^7 M^{-1} , aproximadamente 10^8 M^{-1} , y aproximadamente 10^9 M^{-1} , y aproximadamente 10^{10} M^{-1} . Las afinidades de moléculas de unión según la presente invención pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo, las descritas por Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660 (1949).

Determinadas moléculas de unión específica a CD37 contempladas por la invención presentan afinidades por CD37 de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 nM. Determinadas moléculas de unión específica a CD20 contempladas por la invención presentan afinidades por CD20 de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 nM.

Otra característica de determinadas moléculas de unión a CD37 y de moléculas de unión a CD20 contempladas por la invención es que presentan una vida media en circulación de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 días.

Los anticuerpos específicos de CD37 que caracterizaron el antígeno CD37 en el "Thrid HLDA Workshop" fueron HD28, G28-1, HH1, B14, WR17 y F93G6. Véase, Ling y MacLennan, pág. 302-335 en *Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press (1987). Otros anticuerpos específicos de CD37 que han sido descritos incluyen RFB-7, Y29/55, MB-1, M-B371, M-B372 e IPO-24. Véase, Moldenhauer, J. *Biol., Regul. Homeost. Agents*, 14: 281-283 (2000), que establece que todos estos anticuerpos reconocen solo un epítipo de CD37. Schwartz-Albiez et al., 14: 905-914 (1988) indican que el epítipo está situado en el resto de carbohidrato de la CD37. Otro anticuerpo específico de CD37 es S-B3 (Biosys).

Las patentes y publicaciones de patente que describen anticuerpos de CD20 incluyen las Patentes de EE.UU. N° 5.776.456, 5.736.137, 6.399.061 y 5.843.439, así como las solicitudes de patente de EE.UU. N° US 2002/0197255A1 y US 2003/0021781A1 (Anderson et al.); la Pat. de EE.UU. N° 6.455.043B1 y WO00/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO00/27428 (Grillo-Lopez y White); WO00/27433 (Grillo-Lopez y Leonard); WO00/44788 (Braslawsky et al.); WO01/10462 (Rastetter, W.); WO01/10461 (Rastetter y White); WO01/10460 (White y Grillo-Lopez); solicitud de patente de EE.UU. N° US2002/0006404 y WO02/04021 (Hanna y Hariharan); solicitud de patente de EE.UU. N° US2002/0012665 A1 y WO01/74388 (Hanna, N.); solicitud de patente de EE.UU. N° US2002/0009444A1, y WO01/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO01/97858 (White, C.); solicitud de patente de EE.UU. N° US2002/0128488A1 y WO02/34790 (Reff, M.); WO02/060955 (Braslawsky et al.); WO02/096948 (Braslawsky et al.); WO02/079255 (Reff y Davies); Patente de EE.UU. N° 6.171.586B1, y WO98/56418 (Lam et al.); WO98/58964 (Raju, S.); WO99/22764 (Raju, S.); WO99/51642, Patente de EE.UU. N° 6.194.551B1, Patente de EE.UU. N° 6.242.195B1, Patente de EE.UU. N° 6.528.624B1 y Patente de EE.UU. N° 6.538.124 (Idusogie et al.); WO00/42072 (Presta, L.); WO00/67796 (Curd et al.); WO01/03734 (Grillo-Lopez et al.); solicitud de patente de EE.UU. N° US 2002/0004587A1 y WO01/77342 (Miller y Presta); solicitud de patente de EE.UU. N° US2002/0197256 (Grewal, I.); Patentes de EE.UU. N° 6.090.365B1, 6.287.537B1, 6.015.542, 5.843.398 y 5.595.721, (Kaminski et al.); Patentes de EE.UU. N° 5.500.362, 5.677.180, 5.721.108 y 6.120.767 (Robinson et al.); Patente de EE.UU. N° 6.410.391B1 (Raubitschek et al.); Patente de EE.UU. N° 6.224.866B1 y WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO01/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO00/67795 (Goldenberg); WO00/74718 (Goldenberg y Hansen); WO00/76542 (Golay et al.); WO01/72333 (Wolin y Rosenblatt); Patente de EE.UU. N° 6.368.596B1 (Ghetle et al.); solicitud de patente de EE.UU. N° US2002/0041847A1, (Goldenberg, D.); solicitud de patente de EE.UU. N° US2003/0026801A1 (Weiner y Hartmann); WO02/102312 (Engleman, E.). Véase también, patente de EE.UU. N° 5.849.898 y solicitud de patente EP N° 330.191 (Seed et al.); patente de EE.UU. N° 4.861.579 y EP332.865A2 (Meyer y Weiss); y WO95/03770 (Bhat et al.).

El rituximab ha sido aprobado para uso clínico en humanos como Rituxan®. Se considera que el Rituxan® es una molécula de unión específica a CD20 de la invención.

Se considera que los productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIPs) son un tipo de moléculas de unión de la invención. Los métodos para preparar SMIPs han sido descritos previamente en la solicitud de patente de EE.UU. n° 10/627.556 y en las Publicaciones de Patente de EE.UU. 20030133939, 20030118592 y 20050136049. Los SMIPs son nuevas proteínas de fusión de inmunoglobulina-dominio de unión que generalmente presentan un dominio de unión para una estructura semejante tal como un antígeno, un contrarreceptor o similar, un polipéptido de región de bisagra de IgG1, IGA o IgE, o un polipéptido de región de bisagra de IgG1 mutante que tiene cero, uno o dos residuos de cisteína, y dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3. En una realización, la molécula de dominio de unión tiene uno o dos residuos de cisteína (Cys) en la región de bisagra. En una realización relacionada, cuando la molécula de dominio de unión comprende dos residuos Cys, la primera Cys, que participa en la unión entre la cadena pesada y la cadena ligera, no es eliminada o sustituida por un aminoácido.

Se contempla que el dominio de unión de moléculas útiles en los métodos de la invención tenga una o más regiones de unión, tal como regiones de unión de cadena ligera variable y regiones de unión de cadena pesada derivadas de uno o más miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tal como una inmunoglobulina. Además, estas regiones están separadas habitualmente por péptidos de enlace, que pueden ser cualquier péptido de enlace conocido en la técnica que sea compatible con el dominio o región que participe en la unión dentro de una molécula de unión. Los ejemplos de enlaces son ligandos basados en la estructura de ligando Gly₄Ser, tal como (Gly₄Ser)_n, donde n=1-5. Las moléculas para uso en los métodos de la invención también contienen suficiente secuencia de aminoácido derivada de una región constante de una inmunoglobulina para proporcionar una función efectora, preferiblemente ADCC y/o CDC. Por tanto, las moléculas tendrán una secuencia derivada de un dominio CH2 de una inmunoglobulina o dominios CH2 y CH3 derivados de una o más inmunoglobulinas. Los SMIPs tienen capacidad para ADCC y/o CDC, pero su capacidad para formar multímeros enlazados por puentes de disulfuro está comprometida.

La descripción incluye polipéptidos de SMIP específicos de CD37 humanizados que exhiben una identidad de al menos el 80 por ciento con respecto al polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 2, donde el polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado se une a CD37. En un aspecto, los polipéptidos de SMIP específicos de CD37 humanizados comprenden cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 48 y 52. En otro aspecto, los polipéptidos de SMIP específicos de CD37 humanizados comprenden al menos

una modificación de aminoácido en una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada del grupo que consiste en: CDR1 de cadena ligera, CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena ligera, CDR2 de cadena pesada, CDR3 de cadena ligera y CDR3 de cadena pesada.

- 5 En una realización, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la CDR1 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 (RASENVYSYLA). La descripción también incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la CDR1 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 (RTSENVYSYLA). La invención además incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la CDR1 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63 (GYNMN).
- 10 En otra realización, la invención incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la CDR2 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64 (FAKTLAE). La invención también incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la CDR2 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65 (NIDPYYGGTTYNRKFKG).
- 15 En una realización adicional, la invención incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la CDR3 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66 (QHSDNPWT). La invención además incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 (SVGPFDY). La invención además incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 (SVGPFDS). La descripción también incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69 (SVGPM DY).
- 20 En otro aspecto, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado que comprende al menos uno, al menos dos o al menos tres secuencia(s) de las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 61, 62, 64 y 66. En otra realización, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NOS: 61 ó 62, o una variante de las mismas en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NOS: 61 ó 62 ha sido cambiado; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 64 , o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 64 ha sido cambiado; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 66 , o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 66 ha sido cambiado.
- 25 En otro aspecto adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado que comprende al menos uno, al menos dos o al menos tres de las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 63, 65 y 67-69. En una realización adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 63 , o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 63 ha sido cambiado; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 65 , o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 65 ha sido cambiado; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 67-69, o una variante de las mismas en la que uno o dos aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NOS: 67-69 han sido cambiados.
- 30 La descripción también incluye polipéptidos de SMIP específicos de CD37 humanizados que comprenden al menos una modificación de aminoácido en una región estructural (FR) seleccionada del grupo que consiste en: FR1 de cadena ligera, FR1 de cadena pesada, FR2 de cadena ligera, FR2 de cadena pesada, FR3 de cadena ligera, FR3 de cadena pesada, FR4 de cadena ligera y FR4 de cadena pesada. En una realización, la invención incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la primera región estructural (FR1) de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC). En otra realización, la invención incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la FR1 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 (EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT). En otra realización adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la FR2 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72 (WYQQKPGQAPRLIY). En una realización adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la FR2 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73 (WVRQMPGKGLEWMG). En otra realización adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la FR3 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74 (GIPARFSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYC). En otra realización adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la FR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75 (QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR). En otra realización adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la FR4 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 (FGQGTKVEIK). En otra realización adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la FR4 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77 (WGQGTLTVTVSS). En otra

realización adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la FR4 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 (WGQGTLTVSS).

La descripción incluye además polipéptidos de SMIP específicos de CD37 humanizados que comprende al menos uno, al menos dos o al menos tres secuencia(s) de las secuencias de aminoácidos de FR de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 70, 72, 74 y 76. En una realización, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado que comprende una secuencia de aminoácidos de FR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 70, o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 70 ha sido cambiado; una secuencia de aminoácidos de FR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 72, o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 72 ha sido cambiado; una secuencia de aminoácidos de FR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 74, o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 74 ha sido cambiado; y una secuencia de aminoácidos de FR4 de cadena ligera de SEQ ID NO: 76, o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 76 ha sido cambiado.

Adicionalmente, la descripción incluye polipéptidos de SMIP específicos de CD37 humanizados que comprende al menos uno, al menos dos o al menos tres secuencia(s) de las secuencias de aminoácidos de FR de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 71, 73, 75, 77 y 78. En una realización, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado que comprende una secuencia de aminoácidos de FR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 71, o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 71 ha sido cambiado; una secuencia de aminoácidos de FR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 73, o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 73 ha sido cambiado; una secuencia de aminoácidos de FR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 75, o una variante de la misma en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NO: 75 ha sido cambiado; y una secuencia de aminoácidos de FR4 de cadena pesada de SEQ ID NOS: 77 ó 78, o una variante de las mismas en la que uno o dos aminoácidos de SEQ ID NOS: 77 ó 78 ha sido cambiado;

La descripción también incluye una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de SIMP específico de CD37 humanizado que presenta una identidad de al menos el 80 por ciento con respecto al polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 2, donde el polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado se une a CD37. Dicha molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOS: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 79, 81, 83, 85 y 87. En una realización, la invención incluye vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico y células hospedantes que comprenden los vectores.

La descripción también incluye procesos para producir los polipéptidos descritos en la presente memoria, que comprenden cultivar las células hospedantes en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido, y opcionalmente aislar los polipéptidos del cultivo.

En otro aspecto adicional, la invención incluye composiciones que comprenden los polipéptidos de SMIP específicos de CD37 humanizados de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La descripción incluye además el uso de los SMIP específicos de CD37 y de las moléculas de unión específica a CD37 descritas en la presente memoria en cualquiera de los métodos de la invención. Dichos métodos incluyen el uso de cualquiera de los SMIP específicos de CD37 y de las moléculas de unión específica a CD37 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 80, 82, 84, 86 y 88.

En otro aspecto adicional, la descripción incluye kits para reducir células B que comprende las composiciones de la invención; y protocolos para usar los kits para reducir células B. Dichos kits pueden comprender además una o más molécula(s) de unión específica a CD20. La invención contempla que dicha molécula de unión específica a CD20 sea TRU-015.

La descripción también incluye polipéptidos de SMIP específicos de CD37 humanizados que comprenden una CDR1, una CDR2 y una CDR3, que presentan una identidad de al menos el 80 por ciento con respecto al polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 2. Dichos polipéptidos de SMIP específicos de CD37 pueden comprender adicionalmente un dominio estructural humano que separa la CDR1, la CDR2 y la CDR3.

En otro aspecto, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado que exhibe una identidad de al menos el 80 por ciento con respecto al polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 2, donde el polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado se une a CD37 y comprende un polipéptido de región de bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 115, 116, 118, 120, 122, 124, 126 y 127.

La descripción también contempla un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado que exhibe una identidad de al menos el 80 por ciento con respecto al polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 2, donde el polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado se une a CD37 y comprende un ligando que comprende (Gly4Ser)_n, donde n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

En otro aspecto adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la CDR1 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 128 (RTSQNVYSYLA), 129 (RTSESVYSYLA), 130 (RASQSVYSYLA), 131 (RASQSVSSYLA) y 132 (RASQSVSYLA). En otra realización, la invención incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la CDR1 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 133 (SYMNM) y 134 (SYWIG). En una realización adicional, la invención incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la CDR2 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 135 (AASSLQS), 136 (GASTRAT) y 137 (DASNRAT). En otra realización adicional, la invención incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la CDR2 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 138 (IYPGDS DTRYSPSFQG) y 139 (RIDPSDSYTNYSFQG).

La descripción también incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37 humanizado, donde la CDR3 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 220 (QHHSNDNPWT). En otra realización, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 211 (SVGPMDY), 212 (SVGPFDY), 213 (SVGPMDV), 214 (SVGPFDS), 215 (SVGPFDP), 216 (SVGPFQH), 217 (SVGPFDV), 218 (SVGPFDI) y 219 (SVGPFDL).

En un aspecto adicional, la descripción incluye polipéptidos de SMIP específicos de CD37 con regiones estructurales alternativas. En un aspecto, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la FR1 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 170-181. En otro aspecto, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la FR1 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 140-146. En otro aspecto adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la FR2 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 182-193. En otro aspecto más, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la FR2 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 147-153. En un aspecto adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la FR3 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194-205. En otro aspecto más, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la FR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 154-160. En un aspecto adicional, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la FR4 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 206-210. En otro aspecto más, la descripción incluye un polipéptido de SMIP específico de CD37, donde la FR4 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 161-169.

Los ejemplos de SMIPs específicos de CD37 útiles en la descripción incluyen, aunque sin limitación: G28-1 scFv (SSS-S) H WCH2 WCH3, consiste en un Fv de cadena sencilla de G28-1 en el que los tres residuos de cisteína de las regiones de conexión o de bisagra se han mutado a residuos de serina, y dominios CH2 y CH3 naturales; G28-1 scFv IgAH WCH2 WCH3, que comprende una bisagra de IgA y dominios de IgG1 naturales (WT, del inglés "wild-type"); G28-1 scFv VHL11S (SSS-S) H WCH2 CH3 en el que los tres residuos de cisteína de las regiones de conexión y de bisagra se han mutado a residuos de serina y la leucina de la posición 11 de la región variable de cadena pesada se ha sustituido por una serina; G28-1 scFv VH L11S (CSS-S) H WCH2 CH3, en el que los residuos de cisteína fueron sustituidos en la segunda y tercera posiciones por serina; G28-1 scFv VHL11S (CSC-S) H WCH2 CH3, en el que los residuos de cisteína fueron sustituidos en la segunda posición por serina; G28-1 scFv VH11S (SSC-P) H WCH2 WCH3 (denominado en la presente memoria TRU-016), en el que el primer y el segundo residuos de cisteína de las regiones de conexión y de bisagra han sido mutados a residuos de serina, y la leucina de la posición 11 de la región variable de cadena pesada ha sido sustituida por una serina; G28-1 scFv VH11S (SCS-S) H WCH2 WCH3, en el que el primer y el tercer residuos de cisteína de las regiones de bisagra han sido mutados a residuos de serina; G28-1 scFv VHL11S (CCS-P) H WCH2 WCH3, en el que el tercer residuo de cisteína de la región de bisagra ha sido sustituido por una serina; G28-1 scFv VHL11S (SCC-P) H WCH2 WCH3, en el que la primera cisteína ha sido sustituida por una serina; G28-1 scFv VH L11S mlgE CH2 CH3 CH4, que comprende las regiones CH 2-4 de IgE de ratón en las que la leucina de la posición 11 de la región variable de cadena pesada ha sido sustituida por una serina; G28-1 scFv VH L11S mlgA WlgACH2 T4CH3, que comprende una bisagra de IgA de ratón con un CH2 de IgA natural y un dominio CH3 de IgA truncado que carece de los aminoácidos carboxiterminales GTCY; G28-1 scFv VHL11S hlgE CH2 CH3 CH4, que comprende regiones CH de IgE en las que la leucina de la posición 11 de la región variable de cadena pesada ha sido sustituida por una serina; y G28-1 scFv VHL11S hlgAH WlgACH2 TCH3, que comprende una bisagra de IgA, un CH2 de IgA natural y un CH2 de IgA truncado y un dominio CH3 de IgA truncado que carece de los aminoácidos carboxi GTCY.

Los ejemplos de SMIPs específicos de CD20 útiles en la descripción incluyen los SMIPs derivados del anticuerpo monoclonal anti-CD20 2H7 descrito en las Publicaciones de Patente de EE.UU. 2003133939 y 20030118592. Los SMIPs incluyen 2H7scFv-Ig o un derivado suyo. Los derivados incluyen CytoxB-MHWTG1C, que es un dominio de Fc de IgG1 humana y un dominio de bisagra de IgG1 mutante; El CytoxB-MHMG1C, que comprende un dominio Fc mutado; el MG1H/MG1C, que comprende un receptor Fc con un residuo de leucina 234 mutado; el CytoxB-

IgAHWTHG1C, que comprende una porción de la bisagra de IgA humana fusionada a dominio Fc humano natural; el 2H7 scFv-llama IgG1, que comprende la bisagra de llama IgG1 y regiones CH2CH3, el 2H7 scFv-llama IgG2, que comprende la bisagra llama IgG2 y regiones CH2CH3; el 2H7 scFv-llama IgG3, que comprende la bisagra llama IgG3 y regiones CH2CH3.

- 5 El 2H7 scFv MTH (SSS) WTCH2CH3, en el que los tres residuos de cisteína de las regiones de conexión o de bisagra están mutados a residuos de serina, y los dominios naturales CH2 y CH3; el 2H7 scFv MTH (SSC), en el que los dos primeros residuos de cisteína se sustituyeron por residuos de serina; el 2H7 scFv MTH (SCS), en el que la primera y tercera cisteínas se sustituyeron por residuos de serina; el 2H7 scFv MTH (CSS) WTCH2CH3, en el que los residuos de cisteína se sustituyeron en la segunda y tercera posiciones por serina; el 2H7 scFv VH11SER IgG
- 10 MTH (SSS) WTCH2CH3, en el que la leucina de la posición 11 de la región variable de cadena pesada está sustituida por serina; El 2H7 scFv IgA hinge-IgG1 CH2-CH3, que comprende una región de bisagra (en inglés "hinge") de IgA y dominios de IgG1 WT. El 2H7 scFv IgA hinge-CH2-CH3, que comprende regiones de bisagra de IgA y CH2-3; El 2H7 IgAWH IgACH2-T4CH3, que comprende una bisagra de IgA, un CH2 de IgA natural y un dominio CH3 de IgA truncado que carece de los 4 aminoácidos carboxi GTCY.
- 15 Los derivados con mutaciones en la región CH3 de IgG incluyen 2H7 scFv MTH WTCH2 MTCH3 Y405, en el que el residuo de fenilalanina de la posición 405 (numeración según Kabal et al., ver anterior) se ha sustituido por tirosina; 2H7 scFv MTH WTCH2 MTCH3 A405, en el que la fenilalanina de la posición 405 se ha sustituido por una alanina; scFv MTH WTCH2 MTCH3 A407, en el que el residuo de tirosina de la posición 407 se ha sustituido por una alanina; scFv MTH WTCH2 MTCH3 Y405A407, que comprende las dos mutaciones; y scFv MTH WTCH2 MTCH3 A405A407
- 20 que comprende dos mutaciones.

2H7 scFv MTH (CCS) WTCH2CH3 es una construcción en la que el tercer residuo de cisteína de la región de bisagra de IgG1 se ha sustituido por un residuo de serina. El SMIP 2H7 scFv IgG MTH (SSS) MTCH2WTCH3 comprende una bisagra mutante (MT (SSS)) y un dominio CH2 mutante en el que el residuo 238 (según Ward et al.) ha sido sustituido por una serina.

- 25 Los derivados de 2H7scFv-Ig también incluyen mutantes de scFv 2H7 con mutaciones puntuales en la región de cadena variable pesada. Las siguientes construcciones comprenden todas mutaciones en las que la leucina de la posición 11 de la región variable de cadena pesada se ha sustituido por serina: 2H7 scFv VH11SER IgG MTH (SSS-S) WTCH2CH3, 2H7scFv VHL11S (CSS-S) H WCH2 WCH3, que comprende una región de bisagra mutada como se ha indicado antes; 2H7scFv VHL11S (CSC-S) H WCH2 WCH3 que comprende una región de bisagra mutada como se ha indicado antes; 2H7 scFv VHL11S IgAH IgACH2 T4CH3, comprende la bisagra de IgA, CH2 de IgA WT y CH3 de IgA truncado; 2H7 scFv VHL11 S IgECH2 CH3 CH4, que comprende las regiones CH 2-4 de IgE; 2H7 VHL11S scFv (SSS-S) IgECH3CH4, que comprende una región de bisagra mutada y las regiones CH3 y CH4 de IgE; 2H7 scFv VH L11S mlgE CH2 CH3 CH4, que comprende regiones de IgE de ratón; 2H7 scFv VH L11S mlgAH WIGACH2 T4CH3 comprende las mutaciones descritas anteriormente y una región constante de IgA de ratón que consiste en
- 30 una región de CH2 natural y una región de CH3 mutada; 2H7 scFv VH L11S (SSS-S) H K322S CH2 WCH3 comprende una mutación en la región de CH2 de IgG1 humana en el residuo 322, donde la lisina se ha cambiado por serina; 2H7 scFv VH L11 S (CSS-S) H K322S CH2 WCH3 comprende una región de bisagra mutada como se ha descrito anteriormente, y una región de CH2 mutada como se ha descrito previamente; 2H7 scFv VH L11S (SSS-S) H P331S CH2 WCH3, comprende una región de bisagra mutada como se ha descrito anteriormente, y una región
- 35 CH2 mutada en la que la prolina del residuo 331 se ha cambiado por una serina; 2H7 scFv VH L11S (CSS-S) H P331S CH2 WCH3 comprende una región de bisagra mutada y una mutación de prolina a serina en el residuo 331 de la región CH2; 2H7 scFv VH L11S (SSS-S) H T256N CH2 WCH3, comprende una región de bisagra mutada y una mutación de treonina a asparagina en el residuo 256 de la región CH2; 2H7 scFv VH L11S (SSS-S) H RTPE/QNAK (255-258) CH2 WCH3, comprende una región de bisagra mutada y una serie de mutaciones en la que
- 40 los residuos 255-258 han sido mutados de arginina, treonina, prolina, ácido glutámico a glutamina, asparaginas, alanina y lisina, respectivamente; 2H7 scFv VH L11S (SSS-S) H K290Q CH2 WCH3, comprende una región de bisagra mutada y un cambio de lisina a glutamina en la posición 290; 2H7 scFv VH L11 S (SSS-S) H A339P CH2 WCH3, comprende una región de bisagra mutada y un cambio de alanina por prolina en la posición 339; el SMIP 2H7 scFv (SSS-S) H P238SCH2 WCH3, comprende una región de bisagra mutada y un cambio de prolina a serina
- 45 en la posición 238 en CH2, que es el mismo que 2H7 scFv IgG MTH (SSS) MTCH2WTCH3. 2H7 scFv IgAH IGAHCH2 T18CH3 comprende una bisagra de IgA natural y una región CH2 y una región CH3 con un truncamiento de 18 aminoácidos en el extremo carboxi.
- 50

Una molécula de unión de la descripción puede comprender un dominio extracelular nativo o modificado por ingeniería de otra proteína que mejore la actividad de la molécula de unión. En una realización, el dominio extracelular se selecciona del grupo que consiste en CD154 y CTLA4.

55

Una "combinación sinérgica" de moléculas de unión específicas de CD37 y moléculas de unión específicas de CD20 es una combinación que tiene un efecto que es mayor que la suma de los efectos de las moléculas de unión cuando se administran solas.

- 60 En un aspecto de los usos de la invención, las moléculas de unión se administran en una o más composiciones farmacéuticas. Para administrar las moléculas de unión a humanos o animales de ensayo, es preferible formular las

moléculas de unión en una composición que comprenda uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones alérgicas, o adversas de otro tipo, cuando se administran usando rutas bien conocidas en la técnica, tal como se describe más adelante. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquiera y todos los disolventes útiles clínicamente, medidos de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de absorción, y otros similares.

Además, los compuestos pueden formar solvatos con agua o disolventes orgánicos comunes. Dichos solvatos también son contemplados.

Las composiciones de molécula de unión pueden administrarse oralmente, tópicamente, transdermalmente, parenteralmente, mediante aerosol para inhalación, vaginalmente, rectalmente o por inyección intracraneal. El término parenteral tal como se usa en la presente memoria incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intracisternal, o técnicas de infusión. También se contempla la administración por inyección intravenosa, intradermal, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y por implante quirúrgico en un sitio particular. Generalmente, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser dañinas para el receptor. Se prefiere la inyección, especialmente intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que contienen moléculas de unión usadas de acuerdo a la invención pueden contener vehículos o aditivos farmacéuticamente aceptables dependiendo de la ruta de administración. Los ejemplos de dichos vehículos o aditivos incluyen agua, un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, polivinil alcohol, polivinilpirrolidona, un polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, poliacrílico sódico, alginato sódico, dextrano soluble en agua, carboximetil almidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma de xantano, goma arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerina, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol de estearilo, ácido esteárico, albúmina de suero humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, y otros similares. Los aditivos usados se eligen, sin limitación, entre los anteriores o combinaciones de los mismos, según sea apropiado, dependiendo de la forma de dosis de la presente invención.

La formulación de la composición farmacéutica variará según la ruta de administración seleccionada (p.ej., disolución, emulsión). Una composición apropiada que comprende el anticuerpo a administrar se puede preparar en un vehículo o portador fisiológicamente aceptable. Para disoluciones o emulsiones, los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, disoluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, que incluyen medio salino y tamponado. Los vehículos parenterales pueden incluir disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, aceite de Ringer lactado o aceites fijos. Los vehículos intravenosos pueden incluir diversos aditivos, conservantes, o rellenos fluidos, de nutrientes o de electrolitos.

Una variedad de vehículos acuosos, p.ej. agua, agua tamponada, salino al 0,4%, glicina al 0,3%, o suspensiones acuosas pueden contener el compuesto activo con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales procedentes de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietileno sorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo de etilo, o *n*-propilo, *p*-hidroxibenzoato.

Las composiciones de molécula de unión pueden liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo apropiado antes de su uso. Se ha demostrado que esta técnica es efectiva con inmunoglobulinas convencionales. Se puede emplear cualquier técnica de liofilización y reconstitución. Cabe destacar para los especialistas en la técnica que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad de los anticuerpos y que se pueden tener que ajustar los niveles de uso para compensarlo.

Los polvos dispersables y gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el compuesto activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los ejemplos de agentes dispersantes o humectantes y de agentes de suspensión adecuados están entre los mencionados anteriormente.

La concentración de molécula de unión en estas formulaciones puede variar ampliamente, por ejemplo se seleccionará desde menos de aproximadamente 0,5%, habitualmente al menos aproximadamente 1% y como mucho 15 ó 20% en peso en base principalmente a los volúmenes de fluido, las viscosidades, etc., de acuerdo al modo concreto de administración seleccionado. Por tanto, se podría preparar una composición farmacéutica típica para inyección parenteral que contenga 1 mL de agua tamponada esterilizada, y 50 mg de anticuerpo. Se podría preparar una composición típica para infusión intravenosa que contenga 250 mL de disolución esterilizada de

Ringer, y 150 mg de anticuerpo. Los métodos finales para la preparación de composiciones administrables parenteralmente serán conocidos o resultarán evidentes para los especialistas en la técnica, y se describe con más detalle, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Science", 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980). Una dosis efectiva de anticuerpos se encuentra en el intervalo de 0,01 mg a 1000 mg por kg de peso corporal por administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en la forma de una suspensión acuosa oleaginosa inyectable esterilizada, dispersiones o polvos esterilizados para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones esterilizadas inyectables. La suspensión puede formularse según las técnicas conocidas usando los agentes dispersantes o humectantes y de suspensión adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable esterilizada también puede ser una disolución o suspensión inyectable esterilizada en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable parenteralmente, por ejemplo una disolución en 1,3-butanodiol. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, disolución de Ringer y disolución de cloruro sódico isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos esterilizados como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito se puede emplear cualquier aceite fijo suave, que incluye mono o diglicéridos sintéticos. Adicionalmente, ácidos grasos tales como el ácido oleico tienen uso en la preparación de inyectables.

En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto que se pueda manejar fácilmente con una jeringa. El grado apropiado de fluidez se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timesoral, y similares. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las composiciones útiles para administración se pueden formular con potenciadores de la captación o la absorción para aumentar su eficacia. Dichos potenciadores incluyen, por ejemplo, salicilato, glicocolato/linolato, glicolato, aprotinina, bacitracina, SDS, caprato y similares. Véase, p.ej., Fix (J. Pharm. Sci., 85: 1282-1285, 1996) y Oliyai y Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 521-544, 1993).

Adicionalmente, las propiedades de hidrofiliidad e hidrofobicidad de las composiciones contempladas para uso en la invención están bien equilibradas, potenciando con ello su utilidad para usos tanto *in vitro* como, especialmente, *in vivo*, ya que otras composiciones que carecen de dicho equilibrio tienen una utilidad sustancialmente menor. Especialmente, las composiciones contempladas para uso en la invención tienen un grado apropiado de solubilidad en medios acuosos, lo que permite la absorción y la biodisponibilidad en el cuerpo, mientras que también presentan un grado de solubilidad en lípidos que permite a los compuestos atravesar la membrana celular hacia un sitio putativo de acción. Por tanto, las composiciones de anticuerpos contempladas tienen un máximo de efectividad cuando se administran al sitio de actividad de antígeno diana.

En un aspecto, los usos de la invención incluyen una etapa de administración de una composición de molécula de unión.

Los usos de la invención se llevan a cabo usando cualquier medio aceptado médicamente para introducir un agente terapéutico directa o indirectamente en un individuo mamífero, que incluye, aunque sin limitación, inyecciones, ingestión oral, administración intranasal, tópica, transdermal, parenteral, aerosol de inhalación, vaginal o rectal. El término parenteral tal como se usa en la presente memoria incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares e intracisternales, así como técnicas de catéter e infusión. También se contempla la administración por inyección intradermal, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o por implante quirúrgico en un sitio particular.

En una realización, la administración se lleva a cabo en el sitio de un cáncer o tejido afectado que necesite tratamiento por inyección directa en el sitio o a través de un mecanismo de administración sostenida o liberación sostenida, que puede administrar internamente la formulación. Por ejemplo, se pueden incluir microesferas o cápsulas biodegradables u otras configuraciones de polímeros biodegradables capaces de una administración sostenida de una composición (p.ej., un polipéptido, anticuerpo o molécula pequeña solubles) en las formulaciones de la invención implantadas cerca del cáncer.

Las composiciones terapéuticas también se pueden administrar al paciente en múltiples sitios. Las administraciones múltiples se pueden hacer simultáneamente o pueden administrarse a lo largo de un periodo de tiempo. En determinados casos es beneficioso proporcionar un flujo continuo de la composición terapéutica. Se puede administrar una terapia adicional con una periodicidad, por ejemplo, horaria, diaria, semanal o mensual.

Las composiciones de moléculas de unión para uso en la invención pueden comprender una, o pueden comprender más de una, moléculas de unión. También se contempla en la presente invención la administración de composiciones de moléculas de unión en conjunción con un segundo agente. Los agentes secundarios contemplados por la invención se enumeran en los siguientes párrafos.

- 5 Un segundo agente puede ser una molécula asociada a células B. Otras moléculas asociadas a células B contempladas por la invención incluyen moléculas de unión que se unen a moléculas de superficie de células B que no son CD37 o CD20. Las moléculas asociadas a células B incluyen, aunque sin limitación, CD19 (antígeno CD19 de linfocitos B, también denominado antígeno B4 de superficie de linfocito B, o Leu-12), CD21, CD22 (receptor CD22 de células B, también denominado Leu-14, molécula de adhesión a célula de linfocito B, o BL-CAM), CD23, CD40
- 10 (antígeno CD40 de superficie de células B, también denominado miembro nº5 de la superfamilia de receptores de Factor de Necrosis Tumoral, receptor CD40L, o Bp50), CD80 (antígeno CD80 de activación de linfocitos T, también denominado antígeno de activación B7-1, B7, B7-1 o BB1), CD86 (antígeno CD86 de activación de linfocitos T, también denominado antígeno de activación B7-2, B70, FUN-1 o BU63), CD137 (también denominado miembro nº9 de la superfamilia de receptores de Factor de Necrosis Tumoral), CD152 (también denominado proteína 4 de linfocito T citotóxico o CTLA-4), L6 (antígeno L6 asociado a tumor, también denominado miembro nº1 de superfamilia de Transmembrana 4, marcador 1 de superficie de componente de Membrana, o M3S1), CD30
- 15 (antígeno CD30 de activación de linfocitos, también denominado miembro nº8 de la superfamilia de receptor de Factor de Necrosis Tumoral, receptor CD30L o Ki-1), CD50 (también denominado molécula-3 de adhesión intercelular (ICAM3) o ICAM-R), CD54 (también denominado molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM1) o receptor de rinovirus de grupo principal), B7-H1 (ligando de un receptor inmunoinhibidor expresado por células T, células B y células mieloides activadas, también denominado PD-L1; véase Dong, et al., "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion," Nat. Med., 5: 1365-1369 (1999), CD134
- 20 (también denominado miembro nº4 de la superfamilia de receptor de Factor de Necrosis Tumoral; OX40, receptor OX40L, antígeno ACT35 o receptor de glicoproteína 1 activado transcripcionalmente de TAX), 41BB (receptor de ligando 4-1BB, antígeno de células T 4-1BB o antígeno de células T ILA), CD153 (también denominado miembro nº8 de la superfamilia de ligandos de Factor de Necrosis Tumoral, ligando CD30 o CD30-L), CD154 (también denominado miembro nº5 de la superfamilia de ligandos de Factor de Necrosis Tumoral, proteína de activación relacionada con TNF, TRAP, o antígeno Gp39 de antígeno de células T) y receptores Toll. La lista anterior de dianas de construcción y/o antígenos de dianas solamente es un ejemplo no siendo exhaustiva.
- 25 Las citocinas y los factores de crecimiento son agentes secundarios contemplados en la invención e incluyen, sin limitación, uno o más de TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombopoietina, factor de células madre y eritropoietina. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo a la invención también pueden incluir otras angiopoietinas conocidas, por ejemplo Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y y/o el polipéptido de tipo angiopoietina humana, y/o factor de crecimiento
- 30 endotelial vascular (VEGF). Los factores de crecimiento para uso en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen angiogenina, proteína-1 morfogénica ósea, proteína-2 morfogénica ósea, proteína-3 morfogénica ósea, proteína-4 morfogénica ósea, proteína-5 morfogénica ósea, proteína-6 morfogénica ósea, proteína-7 morfogénica ósea, proteína-8 morfogénica ósea, proteína-9 morfogénica ósea, proteína-10 morfogénica ósea, proteína-11 morfogénica ósea, proteína-12 morfogénica ósea, proteína-13 morfogénica ósea, proteína-14 morfogénica ósea, proteína-15 morfogénica ósea, receptor IA de proteína morfogénica ósea, receptor IB de proteína morfogénica ósea, factor neurotrófico derivado de cerebro, factor neutrófico ciliar, receptor α de factor neutrófico ciliar, factor 1 quimiotáctico neutrófilo inducido por citocina, factor 2 α quimiotáctico neutrófilo inducido por citocina, factor 2 β quimiotáctico neutrófilo inducido por citocina, factor de crecimiento celular endotelial β , endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, atractor de neutrófilo derivado de epitelio, factor 4 de crecimiento de fibroblasto, factor 5
- 35 de crecimiento de fibroblasto, factor 6 de crecimiento de fibroblasto, factor 7 de crecimiento de fibroblasto, factor 8 de crecimiento de fibroblasto, factor 8b de crecimiento de fibroblasto, factor 8c de crecimiento de fibroblasto, factor 9 de crecimiento de fibroblasto, factor 10 de crecimiento de fibroblasto, factor ácido de crecimiento de fibroblasto, factor básico de crecimiento de fibroblasto, receptor α 1 de factor neutrófico derivado de línea celular glial, receptor α 2 de factor neutrófico derivado de línea celular glial, proteína relacionada con el crecimiento, proteína α relacionada con el crecimiento, proteína β relacionada con el crecimiento, proteína γ relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocito, receptor de factor de crecimiento de hepatocito, factor I de crecimiento de tipo insulina, receptor de factor de crecimiento de tipo insulina, factor II de crecimiento de tipo insulina, proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocito, factor inhibidor de leucemia, receptor α de factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de nervio, receptor de factor de crecimiento de nervio, neurotrofina-3, neurotrofina-4, factor de crecimiento de placenta, factor 2 de crecimiento de placenta, factor de crecimiento de célula endotelial derivado de plaqueta, factor de crecimiento derivado de plaqueta, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaqueta, factor AA de crecimiento derivado de plaqueta, factor AB de crecimiento derivado de plaqueta, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaqueta, factor BB de crecimiento derivado de plaqueta, receptor α de factor de crecimiento derivado de plaqueta, receptor β de factor de crecimiento de plaqueta, factor estimulante de crecimiento de pre-célula B, factor de célula madre, receptor de factor de célula madre, factor α de crecimiento transformante, factor β de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante, factor β 1.2 de crecimiento transformante, factor β 2 de crecimiento transformante, factor β 3 de crecimiento transformante, factor β 5 de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante latente, proteína I de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína II de
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

unión a factor β de crecimiento transformante, proteína III de unión a factor β de crecimiento transformante, receptor de factor de necrosis tumoral de tipo I, receptor de factor de necrosis tumoral de tipo II, receptor de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, factor de crecimiento endotelial vascular, y proteínas quiméricas y fragmentos biológica o inmunológicamente activos de los mismos.

- 5 Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos contemplados como agentes secundarios incluyen, aunque sin limitación, agentes alquilantes, tal como mostazas de nitrógeno (p.ej., mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano y clorambucil); nitrosoureas (p.ej., carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y semustina (metil-CCNU)); etileniminas y metil-melaminas (p.ej., trietilenmelamina (TEM), trietilen tiofosforamida (tiotepa), y hexametilmelamina (HMM, altretamina)); alquil sulfonatos (p.ej., busulfán); y triacinas (p.ej., dacabacina (DTIC)); antimetabolitos, tal como análogos de ácido fólico (p.ej., metotrexato, trimetrexato y pemetrexed (antifolato multi-diana)); análogos de pirimidina (tales como 5-fluorouracilo (5-FU), fluorodesoxiuridina, gemcitabina, citosina arabinósido (AraC, citarabina), 5-azacitidina y 2,2'-difluorodesoxicitidina); y análogos de purina (p.ej., 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fosfato de fludarabina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA)); inhibidores de topoisomerasa de Tipo I tales como camptotecina (CPT), topotecán e irinotecán; productos naturales, tales como epipodofilotoxinas (p.ej., etoposide y teniposide); y alcaloides vinca (p.ej., vinblastina, vincristina y vinorelbina); antibióticos anti-tumorales tales como actinomicina D, doxorubicina y bleomicina, radiosensibilizantes tales como 5-bromodesoxiuridina, 5-iododesoxiuridina y bromodesoxicitidina; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, ureas sustituidas, tales como hidroxiurea; y derivados de metilhidracina tales como N-metilhidracina (MIH) y procarbina.
- 10
- 15
- 20 Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos y otros agentes activos y auxiliares se muestran también en la Tabla 1.

TABLA 1

Agentes de alquilación	Productos naturales
Mostazas de nitrógeno	Fármacos antimitóticos
mecloretamina	
ciclofosfamida	
ifosfamida	Taxanos
melfalán	paclitaxel
clorambucil	Alcaloides vinca
	vinblastina (VLB)
Nitrosoureas	vincristina
carmustina (BCNU)	vinorelbina
lomustina (CCNU)	Taxotere® (docetaxel)
semustina (metil-CCNU)	estramustina
	fosfato de estramustina
Etilenimina/Metil-melamina	
trietilenmelamina (TEM)	Epipodofilotoxinas
trietilen tiofosforamida (tiotepa)	etoposide
	teniposide
hexametilmelamina (HMM, altretamina)	
	Antibióticos
	actinomicina D
Sulfonatos de alquilo	daunomicina (rubido-micina)
busulfán	doxorubicina (adria-micina)
	mitoxantroneidarrubicina
Triacinas	bleomicina
dacarbacina (DTIC)	esplicamicina (mitramicina)
	mitomicina
Antimetabolitos	dactinomicina

Agentes de alquilación	Productos naturales
Mostazas de nitrógeno	Fármacos antimetabólicos
Análogos de ácido fólico	afidicolina
metotrexato	
Trimetrexato	Enzimas
Pemetrexed (antifolato multi-diana)	L-asparaginasa
	L-arginasa
Análogos de pirimidina	Radiosensibilizantes
5-fluorouracilo	metronidazol
fluorodesoxiuridina	misonidazol
gemcitabina	desmetilmisonidazol
citosina arabinósido (AraC, citarabina)	pimonidazol
	etanidazol
5-azacitidina	nimorazol
2,2'- difluorodesoxi-citidina	RSU 1069
	EO9
topotecán	mitoxantrona
irinotecán	
Análogos de purina	RB 6145
6-mercaptopurina	SR4233
6-tioguanina	nicotinamida
azatioprina	5-bromodesoxiuridina
2'-desoxicoformicina (pentostatina)	5-iododesoxiuridina
	bromodesoxicitidina
eritrohidroxinonil-adenina (EHNA) fludarabina fosfato	
2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA)	
	Agentes varios
	Complejos de coordinación de platino
	cisplatino
	Carboplatino
Inhibidores de Topoisomerasa de Tipo I	oxaliplatino
camptotecina	Antracenodiona
	Urea sustituida
Modificadores de respuesta biológica	hidroxiurea
G-CSF	
GM-CSF	Derivados de metilhidracina
	N-metilhidracina (MIH)
Agentes de diferenciación	procarbina
derivados de ácido retinoico	
	Supresor adrenocortical
Hormonas y antagonistas	mitotano (o,p'- DDD)
Adrenocorticosteroides/ antagonistas	ainoglutetimida
prednisona y equivalentes	

Agentes de alquilación	Productos naturales
Mostazas de nitrógeno	Fármacos antimetabólicos
dexametasona	Citocinas
ainoglutetimida	interferón (α , β , γ)
	interleucina-2
Progestinas	
caproato de hidroxiprogesterona	Fotosensibilizantes
acetato de metoxiprogesterona	derivados de hematoporfirina
acetato de megestrol	Photofrin®
	derivados de benzoporfirina
Estrógenos	Npe6
dietilestilbestrol	etioporfirina de estaño (SnET2)
etinil estradiol/ equivalentes	feoboruro-a
	bacterioclorofil-a
Antiéstrógeno	naftalocianinas
tamoxifén	ftalocianinas
	ftalocianinas de zinc
Andrógenos	
propionato de testosterona	Radiación
fluoximesterona/equivalentes	rayos-X
	luz ultravioleta
Antiandrógenos	radiación gamma
flutamide	luz visible
liberador de gonadotropina	radiación infrarroja
análogos de hormona	radiación microondas
leuprolide	
Antiandrógenos no esteroideos	
flutamide	

Los agentes secundarios contemplados por la invención para el tratamiento de enfermedades autoinmunes son denominados agentes inmunosupresores, que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmunitario del individuo que está siendo tratado. Los agentes inmunosupresores incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), analgésicos, glucocorticoides, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) para el tratamiento de artritis, o modificadores de la respuesta biológica. Las composiciones de la descripción DMARD también son útiles para el tratamiento de muchas otras enfermedades autoinmunes además de la AR.

Los ejemplos de NSAIDs se eligen del grupo que consiste en ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de Cox-2 tales como Vioxx y Celebrex, y sialilatos. Los ejemplos de analgésicos se eligen del grupo que consiste en acetaminofén, oxicodona, tramadol de hidrócloruro de propoxifén. Los ejemplos de glucocorticoides se eligen del grupo que consiste en cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona o prednisona. Los ejemplos de modificadores de respuesta biológica incluyen, aunque sin limitación, moléculas dirigidas contra marcadores de superficie celular (p.ej. CD4, CD5, etc.), inhibidores de citocina, tales como los antagonistas de TNF (p.ej., etanercept (Enbrel), adalimumab (Humira) y infliximab (Remicade)), inhibidores de quimiocina e inhibidores de molécula de adhesión. Los modificadores de respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales, así como formas recombinantes de moléculas. Los ejemplos de DMARDs incluyen, aunque sin limitación, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalacina, hidroxicloroquina, Oro [oral (auranofin) e intramuscular] y minociclina.

Se contempla que la composición de molécula de unión y el agente secundario sean administrados simultáneamente en la misma formulación. Alternativamente, los agentes se administran en una formulación separada pero concurrentemente, refiriéndose la concurrencia a agentes administrados con una diferencia de a lo sumo 30 minutos.

- 5 En otro aspecto, el agente secundario se administra antes de la administración de la composición de la molécula de unión. Administrar antes se refiere a una administración del agente secundario en el rango que va desde una semana antes al tratamiento con el anticuerpo hasta 30 minutos antes de la administración del anticuerpo. Se contempla además que el agente secundario se administre a continuación de la administración de la composición de molécula de unión. La administración a continuación pretende indicar una administración que se produce entre 30 minutos después del tratamiento con anticuerpo y hasta una semana después del tratamiento con anticuerpo.

10 Se contempla además que cuando la molécula de unión se administra en combinación con un agente secundario, donde el agente secundario es una citocina o un factor de crecimiento, o un agente quimioterapéutico, la administración también puede incluir el uso de un agente radioterapéutico o de terapia de radiación. La terapia de radiación administrada en combinación con una composición de anticuerpo se administra según determine el médico al cargo, y en las dosis suministradas típicamente a pacientes en tratamiento de cáncer.

15 Las cantidades de molécula de unión en una dosis dada variarán según el tamaño del individuo al que se esté administrando la terapia, así como según las características del trastorno tratado. En ejemplos de tratamientos, puede ser necesario administrar aproximadamente 1 mg/día, aproximadamente 5 mg/día, aproximadamente 10 mg/día, aproximadamente 20 mg/día, aproximadamente 50 mg/día, aproximadamente 75 mg/día, aproximadamente 100 mg/día, aproximadamente 150 mg/día, aproximadamente 200 mg/día, aproximadamente 250 mg/día, aproximadamente 500 mg/día o aproximadamente 1000 mg/día. Las dosis también se pueden administrar en base al peso del paciente, en una dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg. En una realización relacionada, la molécula de unión puede administrarse en un rango de dosis de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 30 mg/kg. En una realización adicional, la molécula de unión se administra en una dosis de aproximadamente 0,015, aproximadamente 0,05, aproximadamente 0,15, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1,5, aproximadamente 5, aproximadamente 15 o aproximadamente 30 mg/kg.

Estas composiciones pueden administrarse en una única dosis o en dosis múltiples. Los estudios dosis-respuesta estándares, primero en modelos animales y después en ensayos clínicos, revelan dosis óptimas para estados de enfermedad particulares y para poblaciones de pacientes particulares.

- 30 La administración de la composición de molécula de unión disminuye la población de células B en al menos un 20% después de una única dosis de tratamiento. En una realización, la población de células B disminuye en al menos aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90 o aproximadamente 100%. La reducción de células B se define como un descenso del recuento absoluto de células B por debajo del límite inferior del rango normal. La recuperación de células B se define como el retorno del recuento total de células B a cualquiera de las siguientes situaciones: el 70% del valor de línea base del sujeto o del rango normal.

La administración de moléculas de unión específicas de CD20 también da como resultado un aumento de la apoptosis en subgrupos concretos de células B. Apoptosis se refiere a la inducción de muerte celular programada en una célula, manifestada y establecida por fragmentación de ADN, encogimiento celular, fragmentación celular, formación de vesículas de membrana o alteración de la composición lipídica de la membrana, según se determina mediante tinción con anexina V.

Además, la administración de composiciones de moléculas de unión de la invención da como resultado efectos clínicos deseados en la enfermedad o trastorno que esté siendo tratado. Por ejemplo, en pacientes afectados por artritis reumatoide, en un aspecto, la administración mejora la afección del paciente en una cantidad clínicamente significativa [p.ej., alcanza la "American College of Rheumatology Preliminary Detection of Improvement" (ACR20)], y/o una mejoría del 20% en articulaciones blandas e hinchadas y una mejoría del 20% en los 3/5 restantes de las medidas ACR (Felson et al., *Arthritis Rheum.* 1995, 38: 727-35). Las medidas biológicas para determinar la mejoría de un paciente de AR después de la administración de moléculas de unión específicas de CD37 y específicas de CD20 incluyen la medida de cambios en los niveles de citocinas, determinados a través de los niveles de proteína o ARN. Las citocinas de interés incluyen, aunque sin limitación, TNF- α , IL-1, interferones, Blys y APRIL. Los cambios de citocinas pueden deberse a una reducción del número de células B o a una reducción de células T activadas. En pacientes de AR, los marcadores relevantes para tasa de recambio óseo (reabsorción o erosión óseas) se miden antes y después de la administración de moléculas de unión específica a CD20. Los marcadores relevantes incluyen, aunque sin limitación, fosfatasa alcalina, osteocalcina, fragmentos de descomposición de colágeno, hidroxiprolina, fosfatasa ácida resistente a tartrato y ligando RANK (RANKL). Otras lecturas relevantes para la mejoría de la AR incluyen la medición de los niveles de proteína reactiva C (CRP), la tasa de sedimentación de eritrocitos (ESR), el factor reumatoide, anticuerpos CCP (péptido cíclico citrulinado) y la determinación de los niveles de células B sistémicas y del recuento de linfocitos mediante citometría de flujo. También se pueden medir factores específicos procedentes del sinovio de pacientes de AR, que incluye la determinación de los niveles de células B en

sinovio procedente de biopsia de sinovio, los niveles de RANKL y de otros factores óseos y citocinas indicados anteriormente.

En un aspecto relacionado, se miden los efectos de la administración de la combinación en otras enfermedades según los estándares conocidos en la técnica. Por ejemplo, se contempla que los pacientes de enfermedad de Crohn tratados según la invención logren una mejoría en el Índice de Actividad de Enfermedad de Crohn (CDAI) en el intervalo de aproximadamente 50 y aproximadamente 70 unidades, donde la remisión se da a 150 unidades (Simonis et al, Scand. J Gastroent. 1998, 33: 283-8). Una puntuación de 150 ó 200 se considera normal, mientras que una puntuación de 450 se considera una puntuación de enfermedad grave. Adicionalmente es deseable que la administración de las moléculas de unión específica a CD37 y a CD20 de como resultado una reducción de anticuerpos anti-neutrófilos perinucleares (pANCA) y anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) en individuos afectados por enfermedad inflamatoria del intestino.

Se contempla además que los pacientes de miositis adulta y juvenil tratados según la invención alcancen una mejoría en el conjunto central de evaluaciones, tal como 3 de cada 6 mediciones de conjunto central mejoren en aproximadamente un 20%, no empeorando más de 2 de las mediciones centrales en aproximadamente un 25% (véase Rider et al., Arthritis Rheum. 2004, 50: 2281-90).

También se contempla que los pacientes de SLE tratados según la invención alcancen una mejoría en la puntuación de la Medida de Actividad de Lupus Sistémico (SLAM) o del Índice de Actividad de Enfermedad SLE (SLEDAI) en al menos 1 punto (Gladman et al, J Rheumatol 1994, 21: 1468-71) (Tan et al., Arthritis Rheum. 1982, 25: 1271-7). Una puntuación SLAM de >5, o una puntuación SLEDAI >2, se consideran enfermedad clínicamente activa. Se puede definir una respuesta a tratamiento como la mejoría o la estabilización en las 2 medidas de actividad de enfermedad (el Índice de Actividad de Enfermedad SLE [SLEDAI] y la Medida de Actividad de Lupus Sistémico) y en 2 medidas de calidad de vida (determinación general del paciente y la Escala de Gravedad de Fatiga de Krupp) (Petri et al., Arthritis Rheum. 2004, 50: 2858-68.) También se contempla que la administración de la molécula de unión a pacientes de SLE dé como resultado una reducción de los anticuerpos anti-ADN de doble cadena. Alternativamente, la mejoría se puede determinar usando los Criterios del Grupo de Determinación de Lupus de las Islas Británicas (BILAG).

También se contempla que los pacientes de esclerosis múltiple tratados según la invención alcancen una mejoría en la puntuación clínica de la escala de estatus de Discapacidad Expandida de Kurtzke (EDSS) (Kurtzke, F., Neurology 1983, 33: 1444-52) de al menos 0,5, o un retraso en el empeoramiento de la enfermedad clínica de al menos 1,0 en la escala de Kurtzke (Rudick et al., Neurology 1997, 49: 358-63).

También se contempla que los pacientes que padezcan IIM que reciben moléculas de unión específica a CD37 y de unión específica a CD20 alcancen una reducción de al menos uno de los cinco criterios fijados la determinación de los Criterios de Miopatía Inflamatoria Idiopática (IIMC) (Miller, F., ver anterior). Se contempla adicionalmente que la administración a pacientes de IMM dé como resultado una reducción de factores asociados a IMM seleccionados del grupo que consiste en creatina cinasa (CK), lactato deshidrogenasa, aldolasa, proteína reactiva C, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y autoanticuerpo antinuclear (ANA), anticuerpos específicos de miositis (MSA) y anticuerpos de antígenos nucleares extraíbles. Alternativamente, los pacientes cumplen 3 de los 6 criterios establecidos por Rider et al., Arthritis Rheum., 50(7): 2281-2290 (2004), empeorando en no más de 2 criterios.

En algunas realizaciones, los pacientes que padecen un cáncer de células B reciben tratamiento según la invención y demuestran una respuesta general beneficiosa al tratamiento, en base a criterios clínicos bien conocidos y usados comúnmente en la técnica, y como se han descrito previamente, tal como un descenso en el tamaño del tumor, un descenso en el número de tumores y/o una mejoría en los síntomas de la enfermedad.

Los ejemplos de criterios clínicos son proporcionados por el "U.S. National Cancer Institute" (NCI), que ha dividido algunas de las clases de cánceres en las categorías clínicas de linfomas "indolente" y "agresivo". Los linfomas indolentes incluyen linfomas de células foliculares, separados en grados de citología, linfoma linfocítico pequeño difuso/leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoplasmacitoide/macroglobulinemia Waldenstrom, linfoma de zona marginal y leucemia de célula pilosa. Los linfomas agresivos incluyen linfoma de célula grande y mixta difusa, linfoma de Burkitt/linfoma de célula no separada pequeña difusa, linfoma linfoblástico, linfoma de célula manta y linfoma relacionado con SIDA. En algunos casos, el Índice Prognóstico Internacional (IPI) se usa en casos de linfoma folicular y agresivo. Los factores a considerar en el IPI incluyen la edad (<60 años de edad frente a >60 años de edad), lactato deshidrogenasa en suero (niveles normales frente a elevados), estatus de rendimiento (0 ó 1 frente a 2-4) (ver definición más adelante), estadio de la enfermedad (I o II frente a III o IV), e implicación de sitio extranodal (0 ó 1 frente a 2-4). Los pacientes con 2 o más factores de riesgo tienen menos de un 50% de probabilidad de evitar recaídas y de supervivencia global a 5 años.

El estatus de rendimiento del IPI agresivo se define como se indica a continuación: Descripción de Grado: 0 Completamente activo, capaz de portar todo el rendimiento pre-enfermedad sin restricción; 1 Restringido en actividad estrenosa físicamente pero ambulatorio y capaz de llevar a cabo trabajo de una naturaleza ligera o sedentaria, p.ej., trabajo doméstico ligero, trabajo de oficina; 2 Ambulatorio y capaz de cuidarse solo completamente

pero incapaz de llevar a cabo cualquier actividad de trabajo durante aproximadamente más del 50% del tiempo del día; 3 Capaz de autocuidarse solo limitadamente, confinado en cama o silla más del 50% del tiempo del día; 4 Completamente discapacitado, incapaz de cuidarse por sí mismo, totalmente confinado en cama o silla; y, 5 Muerte. (Véase, "The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma". N Engl J Med. 329: 987-94, 1993)

Típicamente, el grado de linfoma se determina clínicamente usando el criterio de que el linfoma de bajo grado normalmente se presenta como una enfermedad nodal y a menudo es indolente o de crecimiento lento. La enfermedad de grado intermedio y alto normalmente se presenta como una enfermedad mucho más agresiva con grandes tumores voluminosos extranodales.

También se usa el sistema de clasificación de Ann Arbor para medir la progresión de tumores, especialmente de linfomas no de Hodgkins. En este sistema, los estadios I, II, III y IV del NHL adulto se pueden clasificar en las categorías A y B dependiendo de si el paciente tiene síntomas generalizados bien definidos (B) o no (A). La designación B se concede a pacientes con los siguientes síntomas: pérdida inexplicada de más del 10% del peso corporal en los 6 meses anteriores a la diagnosis, fiebre inexplicada con temperaturas por encima de 38°C y sudoración nocturna excesiva. Las definiciones de los estadios son como se indica a continuación: Estadio I - implicación de una única región de nodos linfáticos o implicación localizada de un único órgano o sitio extralinfático. Estadio II - implicación de dos o más regiones de nodos linfáticos en el mismo sitio del diafragma o implicación localizada de un único órgano o sitio extralinfático asociado y sus nodos linfáticos regionales con o sin otras regiones de nodos linfáticos en el mismo lado del diafragma. Estadio III - implicación de regiones de nodos linfáticos en ambos lados del diafragma, posiblemente acompañando una implicación localizada de un órgano o sitio extralinfático, implicación del bazo, o ambos. Estadio IV - implicación diseminada (multifocal) de uno o más sitios con o sin implicación de nodos linfáticos asociados o implicación de órgano extralinfático aislado con implicación nodal distante (no regional). Para más detalles, véase "The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma", New England J. Med. (1993) 329: 987-994.

En un aspecto, un efecto terapéutico de los métodos según la invención se determina por el nivel de respuesta, por ejemplo una respuesta parcial se define como reducción tumoral hasta menos de la mitad del tamaño original. Una respuesta completa se define como la eliminación total de enfermedad confirmada mediante evaluación clínica o radiológica. En una realización, el individuo que recibe el tratamiento según la invención demuestra al menos una respuesta parcial al tratamiento.

Según los criterios de Cheson para determinar NHL desarrollados en colaboración con "National Cancer Institute" (Cheson et al., J Clin Oncol. 1999, 17: 1244; Grillo-Lopez et al., Ann Oncol. 2000, 11: 399-408), una respuesta completa se obtiene cuando existe una desaparición completa de toda evidencia clínica y radiográfica detectable de la enfermedad y de síntomas relacionados con la enfermedad, todos los nodos linfáticos han vuelto a su tamaño normal, el bazo ha remitido en tamaño, y la médula ósea está limpia de linfoma.

Una respuesta completa no confirmada se obtiene cuando un paciente muestra una desaparición completa de la enfermedad y el bazo remite en tamaño, pero los nodos linfáticos han remitido en más del 75% y la médula ósea es indeterminada. Una respuesta completa no confirmada cumple y excede los criterios de respuesta parcial. Una respuesta global se define como una reducción de al menos el 50 por ciento de la carga tumoral general.

Se han desarrollado criterios similares para otras formas diversas de cánceres o enfermedades hiperproliferativas y están disponibles fácilmente para el especialista en la técnica. Véase, p.ej., Cheson et al., Clin Adv Hematol Oncol. 2006, 4: 4-5, que describe criterios para determinar CLL; Cheson et al., J Clin Oncol. 2003, 21: 4642-9, que describe criterios para AML; Cheson et al., Blood 2000, 96: 3671-4, que describe criterios para síndromes mielodisplásicos.

En otro aspecto, una respuesta terapéutica en pacientes que tienen un cáncer de células B se manifiesta como una ralentización de la progresión de la enfermedad con respecto a pacientes que no reciben la terapia. La medida de la progresión ralentizada de enfermedad o cualquiera de los anteriores factores puede llevarse a cabo usando técnicas bien conocidas en la técnica, que incluye escáner óseo, escáner CT, escáner de galio, linfangiograma, MRI, escáner PET, ultrasonidos, y similares.

También será evidente que la dosificación puede modificarse si los agentes terapéuticos tradicionales se administran en combinación con agentes terapéuticos de la invención.

Como un aspecto adicional, la invención incluye kits que comprende uno o más compuestos o composiciones útiles en los métodos de la invención envasados de un modo que facilite su uso para practicar el método de la invención. En una realización más sencilla, dicho kit incluye un compuesto o composición descrito en la presente memoria como útil para la práctica de un método de la invención envasado en un recipiente tal como una botella o recipiente sellado, con una etiqueta pegada al envase o incluida en el paquete que describa el uso del compuesto o composición para llevar a la práctica el método de la invención. Preferiblemente, el compuesto o composición está envasado en una forma de dosis unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administración la composición según una ruta preferida de administración o para llevar a la práctica un ensayo de escrutinio. El kit

puede incluir una etiqueta que describa el uso de la(s) composición(es) de molécula de unión en un método de la invención.

La presente descripción comprende también artículos de fabricación.

5 Dichos artículos comprenden moléculas de unión específica a CD37 o moléculas de unión específica a CD20, opcionalmente junto a un vehículo o diluyente farmacéutico, y al menos una etiqueta que describa un método para uso de las moléculas de unión según la invención. Dichos artículos de fabricación también pueden comprender opcionalmente al menos un segundo agente para administración en conexión con las moléculas de unión.

10 La presente invención también cubre el uso de una composición que comprende una molécula de unión específica a CD37 o moléculas de unión específica a CD37 y CD20 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad que implica actividad aberrante de células B.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 La Figura 1A representa la estructura de la molécula TRU-016; la Figura 1B muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE, que demuestra que la proteína expresada migra a un Mw de aproximadamente 110 kDa en condiciones no reductoras, y aproximadamente 52 kDa cuando se somete a condiciones reductoras; y la Figura 1C muestra que la molécula TRU-016 demuestra un alto nivel de unión específica a linfocitos B de sangre periférica humana, y un nivel mucho menor de unión a otras subpoblaciones de células en la puerta de linfocitos de células no B (población negativa en CD19) cuando se analiza mediante citometría de flujo.

La Figura 2A-E muestra inhibición de unión por diferentes reactivos dirigidos a CD37.

20 La Figura 3A demuestra unión de FITC C1q a fórmulas moleculares de TRU-016 incubadas con células B Ramos en suero humano normal con y sin factor de veneno de cobra (CVF); la Figura 3B muestra la actividad de CDC de formas moleculares de TRU-016 incubadas con Células B Ramos en suero humano normal con y sin CVF; y la Figura 3C muestra la actividad de CDC de formas moleculares TRU-016 incubadas con células B Ramos y complemento humano o de conejo.

25 La Figura 4 muestra trazas de cromatografía HPLC de exclusión de tamaño (SEC) obtenidas a partir de purificación GPC del TRU-016, representando la absorbancia frente al tiempo de retención para las diferentes fracciones recogidas.

La Figura 5A muestra las propiedades de unión de las fracciones SEC; la Figura 5B muestra la actividad de actividad CDC de las fracciones SEC; y la Figura 5C muestra la actividad de ADCC de las fracciones SEC.

30 La Figura 6 muestra la actividad de CDC de TRU-015, rituxan, TRU-016 o una combinación de los mismos en células B Ramos.

La Figura 7 muestra el efecto de TRU-016 sobre la actividad de CDC de TRU-015 sobre células DHL-4.

La Figura 8 muestra el efecto de TRU-016 sobre la actividad de CDC de TRU-015 y rituxan.

La Figura 9 muestra el efecto de TRU-016 sobre TRU-015 en un ensayo de CDC.

La Figura 10 muestra el efecto de TRU-016 sobre rituxan en un ensayo de CDC.

35 La Figura 11 muestra la interacción de TRU-015 y TRU-016 en un ensayo de ADCC usando células BJAB.

La Figura 12 muestra la interacción de TRU-015 y TRU-016 en un ensayo de ADCC usando células Daudi.

La Figura 13 muestra la interacción de TRU-015 y TRU-016 en un ensayo de ADCC usando células Ramos.

La Figura 14 muestra el efecto de rituxan, TRU-016 y una combinación de los mismos en la muerte específica de células BJAB.

40 La Figura 15 muestra el efecto de rituxan, TRU-016 y una combinación de los mismos en la muerte específica de células BJAB.

La Figura 16 muestra el efecto de TRU-015, TRU-016 y una combinación de los mismos en la muerte específica de células BJAB.

45 La Figura 17 muestra el efecto de TRU-015, TRU-016 y una combinación de los mismos en la muerte específica de células BJAB.

La Figura 18A-D muestra formas diméricas de TRU-016 no median sólo en la CDC, sino que potencian la actividad de CDC de Rituximab *in vitro*.

La Figura 19A-B demuestra que TRU-016 purificada de proteína A induce apoptosis de células Ramos y Daudi, mientras que las formas diméricas requieren entrecruzamiento.

La Figura 20 muestra que TRU-016 agota preferencialmente células B normales en cultivos de PBMC.

5 La Figura 21 demuestra la eficacia de TRU-016 en comparación con hulgG, rituxan y el tratamiento de combinación de TRU-016 y rituxan sobre el volumen tumoral en animales.

La Figura 22A y B muestran que las formas diméricas de TRU-016 exhiben una actividad antitumoral significativa, medida a través del efecto sobre el volumen tumoral y el porcentaje de supervivencia en un modelo tumoral de xenoinjerto de ratón.

10 La Figura 23 demuestra que los dímeros de TRU-016 no aumentan la actividad de CDC que resulta del tratamiento con reactivos específicos de MHCII, CD19, CD80/86 o CD45.

La Figura 24 muestra el porcentaje de supervivencia en ratones con tumores Ramos (hasta 90 días) tras el tratamiento con TRU-016, rituximab o una combinación de los mismos.

Las Figuras 25 y 26 muestran el porcentaje de supervivencia en ratones con tumores Daudi (hasta 90 días) tras el tratamiento con TRU-016 o rituximab.

15 La Figura 27 muestra que TRU-016 reduce de forma eficaz la viabilidad celular relativa en células tratadas con fludarabina, potenciando con ello el efecto citotóxico de la fludarabina sola.

La Figura 28 muestra que TRU-016 induce una mayor toxicidad celular que la herceptina o el rituximab en líneas celulares resistentes a rituximab.

La Figura 29 muestra que TRU-016 induce fosforilación de tirosina en células B CLL primarias CD19+.

20 La Figura 30A muestra la secuencia de aminoácidos de consenso de la construcción de TRU-016 humanizada nº 019001 (SEQ ID NO: 6) y TRU-016 (SEQ ID NO: 2) con numeración de Kabat; la Figura 30B muestra alineamientos de secuencia de aminoácidos de tres construcciones de TRU-16 humanizadas (019001, 019008 y 109009).

La Figura 31 muestra el ADN y los alineamientos de secuencia de aminoácidos de tres construcciones humanizadas de TRU-016 (019001, 019041 y 019044).

25 La Figura 32 muestra los alineamientos de secuencia formateados FASTA de las mismas tres construcciones humanizadas de TRU-016 (019001, 019041 y 019044).

EJEMPLOS

Aspectos y detalles adicionales de la invención serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos y no limitantes. El Ejemplo 1 describe la producción de una molécula de unión específica a CD37; el
30 Ejemplo 2 demuestra que TRU-016 y varios anticuerpos específicos de CD37 reconocen los mismos o epítomos solapantes; el Ejemplo 3 muestra que el TRU-016 es deficiente en unión a C1q y en activación del mecanismo de activación de complemento clásica; el Ejemplo 4 demuestra actividad y unión de multímeros de TRU-016; el Ejemplo 5 describe la producción de una molécula de unión específica a CD20; el Ejemplo 6 muestra que las combinaciones de TRU-016 con TRU-015 o rituxan aumentan de forma sinérgica la apoptosis en células B; el
35 Ejemplo 7 muestra que las combinaciones de TRU-016 con anticuerpos específicos de CD20 o SMIPs aumentan de forma sinérgica la CDC; el Ejemplo 8 demuestra que el TRU-016 aumenta la actividad de ADCC y CDC de anticuerpos específicos de CD20 y SMIPs; el Ejemplo 9 demuestra que el TRU-016 induce la apoptosis en células B; el Ejemplo 10 muestra que las combinaciones de un SMIP específico de CD37 con anticuerpo específico de CD20 reducen de forma sinérgica el volumen tumoral en un modelo de xenoinjerto tumoral murino; el Ejemplo 11 muestra
40 que un SMIP específico de CD37 solo también reduce el volumen tumoral en un modelo de xenoinjerto tumoral murino; el Ejemplo 12 demuestra que el TRU-016 no afecta la actividad de CDC de otros receptores de superficie de células B; el Ejemplo 13 demuestra que el TRU-016 no aumenta la actividad de CDC de varios receptores diana, que incluyen MHCII, CD19, CD80/86 y CD40; el Ejemplo 14 proporciona datos adicionales que muestran que el TRU-016 aumenta la supervivencia *in vivo* en ratones con tumores; el Ejemplo 15 demuestra que el TRU-016 potencia la muerte celular inducida por fludarabina en células CLL *in vitro*; el Ejemplo 16 muestra que TRU-016 induce la citotoxicidad directa en células resistentes a rituximab; el Ejemplo 17 muestra que TRU-016 induce fosforilación de tirosina en células B CLL primarias CD19+; y el Ejemplo 18 proporciona moléculas TRU-016 humanizadas.

Ejemplo 1

50 Producción de una molécula de unión específica a CD37

Los SMIPs específicos de CD37 se describen en la Solicitud de Patente compartida de EE.UU. N° 10/627.556 y las Publicaciones de Patente N° 2003/133939, 2003/0118592 y 2005/0136049. Un ejemplo de SMIP, el TRU-016, se produce como se describe a continuación.

El TRU-016 [G28-1 scFv VH11S (SSC-P) H WCH2 WCH3] es una proteína de cadena sencilla recombinante que se une al antígeno de CD37. El dominio de unión se basó en la secuencia del anticuerpo G28-1 descrito previamente en las publicaciones de patente enumeradas en el párrafo precedente. El dominio de unión está conectado al dominio efector, los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana, a través de una región de bisagra modificada. El TRU-016 existe como dímero en disolución y el dímero tiene un peso molecular teórico de aproximadamente 106.000 daltons.

Se aisló ARN total procedente de hibridoma de G28-1 usando reactivo Trizol RNA (Gibco) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó ADNc usando 5 µg de ARN, cebadores aleatorios y transcriptasa inversa Superscript II (GIBCO BRL). Los dominios variables fueron clonados usando conjuntos de cebadores degenerados para las diferentes familias de genes VK o VH murinos. Los dominios variables del hibridoma de G28-1 fueron clonados en vectores de clonación PCR 2.1 TOPO (Invitrogen) y se secuenció el ADN de los transformantes con insertos de tamaño correcto. A continuación se usaron regiones variables de cadena pesada y ligera de los clones correctos como plantillas para la amplificación de PCR de un scFv de G28-1 unido en orientación VL-VH con un ligando 15 aa (gly4ser)³. El scFv anti-CD37 se unió a una bisagra de IgG1 humana modificada, dominios CH2 y CH3 (ver la Figura 1A). Con el objetivo de asegurar una expresión adecuada de células de mamífero, se seleccionaron modificaciones de regiones variables que permitieran aumentos significativos en la expresión por parte de células de mamífero. Específicamente, se cambió una leucina por una serina en la posición 11 del scFv. El péptido maduro predicho tiene una longitud de 473 aminoácidos.

La secuencia de polinucleótido que codifica el TRU-016 y la secuencia de aminoácidos del TRU-016 se establecen respectivamente en las SEQ ID NOs: 1 y 2.

Se produjo TRU-016 mediante tecnología de ADN recombinante en un sistema de expresión de células de mamífero de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO transfectadas que producen el SMIP fueron cultivadas en un biorreactor usando medio propietario.

Los SMIPs de TRU-016 fueron purificados de los sobrenadantes de cultivo de CHO mediante cromatografía de afinidad de Proteína A. Usando dPBS, se equilibró una columna de sepharose de 50 mL rProtein A FF (GE Healthcare rProtein A Sepharose FF, n° de catálogo 17-0974-04) a 5,0 mL/min (150 cm/h) durante 1,5 volúmenes de columna (VC). El sobrenadante de cultivo se cargó en la columna de sepharose rProtein A FF con un caudal de 1,7 mL/min usando el AKTA Explorer 100 Air (GE healthcare AKTA Explorer 100 Air, n° de catálogo 18-1403-00), capturando el TRU-016 recombinante. La columna se lavó con dPBS con 5 volúmenes de columna (VC), después con NaCl 1,0 M, fosfato sódico 20 mM, pH 6,0, y a continuación con NaCl 25 mM, NaOAc 25 mM, pH 5,0. Estas etapas de lavado eliminaron las proteínas celulares del CHOs hospedantes no ligadas específicamente de la columna rProtein A que contribuyen a la precipitación del producto después de la elución.

El TRU-016 recombinante fue eluido de la columna con glicina 1000 mM, pH 3,5. Se recuperaron 10 mL de las fracciones del producto eluido y a continuación el producto eluido fue llevado a pH 5,0 con un 20% del volumen eluido de ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES) 0,5 M, pH 6,0. Este producto eluido se preparó para purificación de GPC por concentración de la muestra hasta aproximadamente 25 mg/mL de TRU-016 y a continuación se esterilizó por filtración como preparación para la purificación de GPC.

Entonces la proteína purificada fue sometida a cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) por GPC para alcanzar una mayor purificación de la molécula de TRU-016 (dímero) a partir de agregados de mayor peso molecular. Usando dPBS, se equilibró una columna XK 50/100 (columna cromatográfica vacía GE healthcare XK 50/100, n° de catálogo 18-8753-01) que contenía 1 L de sepharose Superdex 200 FF a 12,6 mL/min (38 cm/h) con 1,5 volúmenes de columna (VC). Se aplicó un volumen máximo de muestra de 54 mL (3% de VC) a la columna. La columna continuó en marcha a 12,6 mL/min y la proteína eluida se fraccionó en fracciones de 40 mL. Se analizó cada fracción para determinar la calidad del producto usando un HPLC analítico, y las fracciones eluidas se agruparon para >95% POI (no agregado) de TRU-016. Dicho agrupamiento resultante fue esterilizado por filtración a 0,22 µm. A continuación se concentró el material y se formuló con fosfato sódico 20 mM y sacarosa 240 mM, con un pH resultante de 6,0. La composición se filtra antes de llevarse a viales de vidrio con una concentración de 10 mg/mL. Cada vial de vidrio contiene 5 mL de TRU-016 (50 mg/vial).

La proteína TRU-016 también fue sometida a análisis de SDS-PAGE en geles de Tris-glicina de Novex al 4-20% (Invitrogen, San Diego, CA). Las muestras fueron cargadas usando tampón de muestra SDS Tris-glicina de Novex (2X) en condiciones reductoras (adición de 1/10 de volumen de agente reductor de muestra NuPAGE) o no reductoras tras calentar a 95°C durante 3 minutos, seguido de electroforesis a 150V durante 90 minutos. Se llevó a cabo una electroforesis usando Tampón de elución SDS de Tris-Glicina Novex 1X (Invitrogen). Los geles fueron teñidos después de la electroforesis con tinte Coomassie SDS PAGE R-250 durante 30 minutos en agitación, y se destiñeron durante al menos una hora. El peso molecular predicho del péptido maduro es de 51,5 kDa. En

condiciones reductoras, la proteína de fusión migra en el peso molecular esperado. En condiciones no reductoras, la molécula migra a aproximadamente 150 kDa (Figura 1B).

También se llevaron a cabo experimentos para determinar que la especificidad de unión del anticuerpo original con el receptor de superficie celular CD37 se mantenía en el TRU-016. Se aislaron PBMCs humanas con gradientes de densidad LSM y se incubaron con TRU-016 sin conjugar y con CD19 anti-humano conjugado a PE. Las células se lavaron y se incubaron con 1:100 FITC GAH IgG (específico de Fc) durante 45 minutos en hielo. Las células se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo de dos colores en un instrumento FACsCalibur usando el software Cell Quest. Se prepararon las células para linfocitos B o linfocitos no B mediante tinción de CD19.

Al aumentar las concentraciones de TRU-016, la señal de FITC del linfocito B (puerta positiva de CD19) aumentó rápidamente de 0,01 a 1,0 µg/mL, hasta que alcanzó saturación a aproximadamente 1 µg/mL o una intensidad de fluorescencia media (MFI) de 1000. Por el contrario, la tinción de la población de linfocitos no B es detectable, pero muy baja, y aumenta lentamente al disminuir la concentración de scFvlg. Por tanto, el patrón de tinción de los anticuerpos monoclonales murinos G28-1 se preserva con el TRU-016 (Figura 1C).

Las moléculas de unión a CD37 según la invención describen estructuras (dominios de unión derivados de anticuerpos, variantes de bisagra, siendo las regiones CH2CH3 iguales o diferentes, y varios isotipos).

Ejemplo 2

El TRU-016 y varios anticuerpos específicos de CD37 se unen al mismo epítipo, o a epítopos solapantes, del CD37

Se llevaron a cabo experimentos para identificar el epítipo de CD37 unido a TRU-016 y otros anticuerpos específicos de CD37 descritos previamente.

MB371 no conjugado (n°555457) y MB371 conjugado a FITC (n°555456) fueron obtenidos de BD Pharmingen (San Jose, CA), BL14 conjugado a FITC (n°0457) de Immunotech/Beckman Coulter (Fullerton, CA), NMN46 conjugado a FITC (n°RDI-CBL 136FT) y NMN46 no conjugado (n°RDI-CBL 136) de RDI (Flanders, NJ), IPO24 conjugado a FITC (n°186-040) e IPO-24 no conjugado (n°186-020) de Ancell Corporation (Bayport, MN), HHI conjugado a FITC (n°3081) y HHI no conjugado (n°3080) de DiaTec.Com (Oslo, Noruega) y WR17 conjugado a FITC (YSRTMCA483F) y WR17 no conjugado (YSRTMCA483S) de Accurate Chemical & Scientific (Westbury, NY). La proteína TRU-016 fue producida como se ha descrito en el Ejemplo 1.

El TRU-016 se conjugó a FITC a Trubion usando un Kit de marcado Molecular Probes Fluororeporter FITC (F6434) según las instrucciones del fabricante como se indica a continuación: el pico de interés (POI, del inglés "peak of interest") de la proteína TRU-016 a 13,5 mg/mL se ajustó a 5 mg/mL con PBS. Se añadió 1 mg (200 µL) a tubos de kit con una barra de agitación, y NaHCO₃ 1 M (ajustado a pH 8,5 con NaOH 6 N), se añadió a una concentración final de 0,1 M. Se añadieron 50 µL de DMSO a 370 µg de FITC y se añadió a los tubos con relaciones molares de 15, 20, 30 y 40 de FITC: proteína usando la siguiente fórmula para determinar los µL de FITC a añadir: [µL de disolución de FITC a añadir = 5 mg/mL de proteína x 0,2 mL x 389 x 100 x relación molar deseada/Peso molecular de TRU-016 (110.000)].

Las reacciones fueron protegidas de la luz y se agitaron continuamente durante 75 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones fueron añadidas a columnas de giro como se describe en el kit y se giraron a 1100 g durante 5 minutos para cambiar de tampón a PBS con azide y eliminar FITC no conjugado. La DO a 280 nm y 494 nm se determinó con gotas de 2 µL en el Nanodrop; el coeficiente de extinción para la TRU-016 se determinó experimentalmente para este instrumento haciendo lecturas de diluciones del SMIP no conjugado de partida, la concentración de cada uno de los conjugados fue de 4,25 mg/mL y se determinaron las siguientes relaciones FITC:proteína: 2,7 FITC/TRU-016 a una relación de 15; 3,7 FITC/TRU-016 a una relación de 20; 4,4 FITC/TRU-016 a una relación de 30; y 5,1 FITC/TRU-016 a una relación de 40.

Se añadió BSA a 3 mg/mL para ayudar a estabilizar la proteína. La unión de cada fracción se determinó a diluciones que oscilaban entre 100-24.300x en Ramos y 3200-25.600 en PBMC humanas. Todos se unieron, pero se eligió la relación MR30 para continuar ya que proporcionó un elevado MFI que se mantuvo por encima del rango de valoración usado, lo que indica que la actividad de unión se vio menos afectada en esta reacción.

Se valoraron los conjugados de anticuerpo marcado con FITC de 10 ng/mL a 10 µg/mL en un estudio de unión inicial para determinar las cantidades óptimas en los estudios de bloqueo: El nivel elegido estaba justo por debajo de las cantidades de saturación, y se mantuvo constante en los ensayos posteriores, mientras que los niveles de anticuerpo de bloqueo aumentaron del orden de 10 veces. Los datos se representaron como el porcentaje de unión máxima frente a la concentración de anticuerpo de bloqueo, de tal modo que los mayores niveles indican un bloqueo menos eficiente, mientras que niveles más bajos indican una actividad de bloqueo más eficiente. Todos los anticuerpos evaluados mostraron actividad de bloqueo de la unión máxima observada sin reactivos no marcados (Figura 2).

A continuación se tiñeron células BJAB, una línea de células B linfoblastoides B (cortesía de Ed Clark, Universidad de Washington) con un panel de varios clones de MABs anti-CD37, que incluye MB371, BL14, NMN46, IPO24, HH1, WR17 y el SMIP TRU-016.

Para los ensayos de unión competitivos, se incubaron $2,5 \times 10^5$ células BJAB en placas de fondo en V de 96 pocillos en medio de tinción (PBS con un 2% de suero de ratón) con los MABs anti-CD37 conjugados a FITC a 1,25 µg/mL en presencia de MAB anti-CD37 no conjugado a las concentraciones indicadas (2,5, 1,25, 0,6 ó 0,3 µg/mL) o medio de tinción durante 45 minutos en hielo a oscuras. Los anticuerpos de bloqueo y los conjugados de anticuerpos marcados con FITC se añadieron a las reacciones antes de la adición de las células. A continuación se lavaron las células 2 ½ veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 1% (nº 19943, USB, Cleveland, Ohio). Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo usando un instrumento FACsCalibur y el software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA).

Para los ensayos de bloqueo cruzado FACs, se incubaron $2,5 \times 10^5$ células BJAB en placas de fondo en V de 96 pocillos en medio de tinción (PBS con un 2% de suero de ratón) en presencia de MAB anti-CD37 no conjugado a 5 µg/mL en medio de tinción durante 45 minutos a temperatura ambiente a oscuras. A continuación se añadieron MABs anti-CD37 conjugados a FITC hasta una concentración final de 2 µg/mL, dando como resultado una dilución de los reactivos no marcados hasta 3,3 µg/mL. A continuación las reacciones fueron incubadas adicionalmente durante 45 minutos a temperatura ambiente a oscuras. Las reacciones se lavaron 2,5 veces con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 1% (nº 19943, USB, Cleveland, Ohio). Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo en un instrumento FACsCalibur usando el software Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA).

Para los ensayos de unión de células, las células fueron suspendidas en PBS (nº 14040-133, Gibco/Invitrogen, Grand Island NY) que contenía un 2% de FBS (nº 16140-071, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY), (medio de tinción) a una concentración de aproximadamente 4×10^6 células/mL. A continuación las células fueron llevadas a placa y las muestras de ensayo se diluyeron en medio de tinción; entonces se añadieron 1:1 hasta las concentraciones finales designadas. Las reacciones fueron incubadas durante 45 minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron y se lavaron 2 veces con PBS. Se añadió IgG anti-humana de cabra FITC (nº H10501, CalTag, Burlingame CA) a una dilución final de 1:50, y se incubó 45 minutos en hielo. Las muestras fueron centrifugadas, lavadas en PBS, después fijadas en 200 µL de paraformaldehído al 1% en PBS (nº 19943, USB, Cleveland, Ohio). Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo en un instrumento FACs Calibur usando el software Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA).

Todos los anticuerpos mostraron una inhibición de la unión dependiente de la dosis, lo que indica que todas las moléculas evaluadas se unen a un epítipo idéntico o estrechamente relacionado. Para cada anticuerpo se observó una potencia diferente de inhibición de la unión. El SMIP de TRU-016 presentó el nivel más alto de actividad de bloqueo entre todas las moléculas evaluadas, mientras que el HH1 proporcionó un nivel intermedio de actividad de bloqueo, y el WR17, el IPO24 bloquearon mejor que el MB371; pero mostraron un bloqueo menos efectivo que otras dos moléculas relacionadas (Figura 2).

Además del análisis de actividad de bloqueo, se llevó a cabo una serie similar de experimentos en la que varios anticuerpos dirigidos a CD37 fueron evaluados para determinar su capacidad para competir unos con otros por la unión al receptor CD37. Los resultados de estos experimentos, como los resultados obtenidos en los estudios de bloqueo para todas las moléculas ensayadas, indicaron que los diversos anticuerpos dirigidos a CD37 y el TRU-016 tenían el mismo epítipo, o epítipos estrechamente solapantes.

Ejemplo 3

El TRU-016 es deficiente en unión a C1q y en activación del mecanismo de activación de complemento clásica

Se llevaron a cabo experimentos para explorar porqué el pico de dímero de TRU-016 no consigue mediar niveles significativos de muerte dependiente de complemento de dianas de células B. Una posibilidad fue que el dímero de TRU-016 muestra una unión reducida a componentes de la cascada de complemento respecto a anticuerpo de IgG1 humana normal. Por tanto, se llevaron a cabo experimentos para determinar si el TRU-016 activa el mecanismo de activación de complemento clásica observando la unión de TRU-016 y C1q. El C1q es una subunidad del complejo de enzima C1 que activa el sistema de complemento de suero, y es el componente de reconocimiento del mecanismo de activación de complemento clásica.

Se llevaron a cabo estudios de unión de C1 q como se ha descrito previamente (Cragg et al., Blood 2004, 103: 2738-2743). Resumidamente, se llevaron a placa células B en medio Iscoves (nº 12440-053, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) sin suero en placas de fondo en V de 96 pocillos a 5×10^5 /pocillo en 100 µL. Las células fueron incubadas con reactivos durante 15 minutos a 37°C, y a continuación se añadió suero humano normal (NHS, nº A113, Quidel Corp., San Diego, CA) diluido en Iscoves hasta un volumen de 50 µL a cada pocillo para una concentración final de 10, 5, 2,5 ó 1,25 % de suero humano. Se añadieron cincuenta µL de medio al pocillo de control. Para los experimentos de factor de veneno de cobra (CVF), se añadió CVF a muestras de complemento de suero humano a 20 Unidades de CVF/mL de suero durante 90 minutos a 37°C antes de la adición de suero a los

ensayos de complemento, y la dilución de suero por CVF se contabilizó cuando se prepararon las diluciones de muestra.

Se incubaron las células más fuente de complemento durante otros 5 minutos más a 37°C, y se lavaron 2 veces con PBS frío (n° 14040-133, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) mediante centrifugación y se volvieron a suspender en 100 µL de PBS. Se transfirieron cincuenta µL de cada pocillo a una segunda placa para una segunda etapa de tinción de control. Ambas placas se tiñeron durante 15 minutos a oscuras en hielo con C1q anti-HU de oveja FITC (n° C7850-06A, US Biological, Swampscott, Mass) o con IgG de oveja FITC (n° 11904-56P, US Biological, Swampscott, Mass). Las muestras fueron lavadas, resuspendidas en PBS frío, y leídas inmediatamente en un citómetro de flujo FACsCalibur y analizadas con software Cell Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA).

El FITC C1q no se une bien a ninguna subfracción de TRU-016 purificada con SEC, aunque la fracción de mayor peso molecular (HMW) o la de agregado de A2 muestra más unión que las otras formas (Figura 3A). Por el contrario, el rituxan mostró un nivel significativo de unión a C1q, particularmente a menores niveles de NHS. La presencia de CVF no consiguió bloquear completamente dicha unión, aunque los niveles de MFI se redujeron significativamente en comparación con medio solo.

A continuación se llevaron a cabo ensayos de CDC para comparar la capacidad de las diferentes subfracciones de las formas purificadas de TRU-016 y de Rituxan para participar en la muerte celular en presencia o en ausencia de CVF y complemento de suero humano (Figura 3B). Los ensayos de CDC se llevaron a cabo usando tinción con yoduro de propidio para discriminar entre células vivas y muertas tras las incubaciones de células diana con anticuerpo, proteínas de fusión, fluido ascítico, formas moleculares de TRU-016 o medio, y una fuente de complemento tal como suero humano. Resumidamente, se pre-incubaron 3×10^5 células B Ramos con reactivos de ensayo durante 30-45 minutos a 37°C antes de la adición de complemento. Las muestras preligadas se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en Iscoves con suero humano (n° A113, Quidel, San Diego, CA) en las concentraciones indicadas, entonces se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Se lavaron las muestras y se añadió yoduro de propidio (n° P-16063, Molecular Probes, Eugene, OR) a una concentración final de 0,5 µg/mL en PBS. Las células se incubaron con el yoduro de propidio durante 15 minutos a temperatura ambiente a oscuras y a continuación se analizaron por citometría de flujo en un instrumento FACsCalibur con software CellQuest (Becton Dickinson).

La muerte celular mediada por la fracción A2 de TRU-016 y Rituxan se vio reducida significativamente en presencia de CVF a pesar de fallar en inhibir completamente la unión de C1 q (Figura 3B).

Entonces se compararon los complementos humano y de conejo en cuanto a actividad de CDC en presencia del TRU-016. Se midió la actividad de CDC de las formas moleculares de TRU-016 incubadas con células B Ramos y complemento humano y de conejo (Figura 3C). Las células B Ramos se añadieron a pocillos con medio libre de suero. Se añadió a las células Rituxan o el dímero, HMW A2, o fracciones pA de TRU-016 para obtener una concentración final de 10 µg/mL, y se incubó durante 15 minutos a 37°C, antes de lavar 1,5X en medio libre de suero y adición de suero humano normal (NHS) o complemento de conejo (Pelfreez) a 10, 5 ó 2,5 %. Las células más la fuente de complemento se cultivaron 90 minutos a 37°C. Las células se lavaron una vez con PBS frío y se añadió yoduro de propidio (Molecular Probes n°P3566) a una concentración final de 0,5 µg/mL en PBS frío. Las células con PI fueron incubadas a oscuras a temperatura ambiente durante 15 minutos y se analizaron por citometría de flujo.

El origen de la fracción de complemento afecta a los resultados de CDC obtenidos (Figura 3C). El complemento de conejo midió niveles de CDC más elevados que el complemento humano en presencia de formas moleculares de TRU-016. Cabe destacar que la forma de dímero del TRU-016 midió bien en CDC usando complemento de conejo, pero muy poco en la actividad de CDC en presencia de complemento humano.

Ejemplo 4

Actividad y Unión de Multímeros de TRU-016

Se llevaron a cabo experimentos para examinar la actividad biológica de formas multiméricas de TRU-016 (multímeros de TRU-016) en disolución. En primer lugar, para determinar el tamaño de la proteína de fusión de TRU-016 en disolución, se analizó el material purificado de proteína A mediante HPLC SEC, que reveló que el TRU-016 existe en formas múltiples en disolución (Figura 4).

Se obtuvieron trazas de cromatografía HPLC de exclusión de tamaño (SEC) a partir de purificación GPC del TRU-016, representando la absorbancia frente al tiempo de retención para las diferentes fracciones recogidas (Figura 4). El TRU-016 se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular inicialmente por cromatografía de afinidad usando Sepharose de proteína A. La molécula recombinante fue eluída de la columna con glicina 100 mM, pH 3,5. Se recuperaron 10 mL de las fracciones del producto eluído y a continuación el producto eluído fue llevado a pH 5,0 con un 20% del volumen eluído de ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES) 0,5 M, pH 6,0. El eluato se preparó para purificación de GPC por concentración de la muestra hasta aproximadamente 25 mg/mL de TRU-016 y a continuación se esterilizó por filtración como preparación para la purificación de GPC. Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión de tamaño en un aparato GE Healthcare AKTA Explorer 100 Air, usando una columna GE healthcare XK y Superdex 200 de grado preparativo (GE Healthcare).

Los conjuntos de HMW o A2 exhibieron un tiempo de retención de aproximadamente 6,23 minutos, mientras que la forma más prominente mostró un tiempo de retención de 8,38 minutos. El patrón de referencia usado aquí (patrón pA o pA std [del inglés, "standard"]) es un material purificado con proteína A que contiene ambos dímeros y formas multiméricas HMW, tal como se muestra en el primer panel de la Figura 4. La forma más prominente, que migra a un tiempo de retención de 8,38 minutos, con alta probabilidad corresponde en la molécula dimérica vista en SDS-PAGE no reducida, y varias formas menores corresponden muy probablemente a multímeros que se asocian a través de interacciones no covalentes, ya que no son evidentes en SDS-PAGE no reductor. Para separar estas formas diferentes de TRU-016, el material obtenido por cromatografía de afinidad en sepharose de proteína A de sobrenadantes de cultivo se purificó adicionalmente mediante GPC y fraccionamiento de HPLC para aislar la forma dimérica (identificada como "dímeros" o "pico de dímeros") de multímeros de mayor peso molecular (identificados como HMW o fracción A2 ag.). Estas tres subfracciones fueron analizadas a continuación de forma separada para determinar la actividad funcional *in vitro* usando ensayos de unión, ADCC y CDC.

Para explorar si las fracciones aisladas en SEC mostraban diferentes propiedades de unión, cada fracción SEC de TRU-016 fue evaluada en términos de unión a células Ramos. Para determinar las propiedades de unión de las fracciones SEC, las células fueron suspendidas en medio de tinción a una concentración de aproximadamente 4×10^6 células/mL y a continuación se llevaron a placa a 50 μ L/pocillo (2×10^5 células/pocillo) en medio de tinción. A continuación se añadieron diluciones en serie de fracciones SEC a pocillos secuenciales, se incubaron durante 45 minutos, se lavaron y se detectó la actividad de unión usando IgG anti-humana de cabra FITC. Las muestras se fijaron en 200 μ L en paraformaldehído al 1% en PBS. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo en un instrumento FACsCalibur usando el software Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA) (Figura 5A).

Para determinar la actividad de CDC de las fracciones SEC, se suspendieron las células a 5×10^5 células/pocillo en 75 μ L de IMDM. Las fracciones SEC de TRU 016 (75 μ L) fueron añadidas a las células al doble de las concentraciones indicadas. Se dejaron proceder las reacciones de unión durante 45 minutos antes de centrifugación y lavado en Iscoves libre de suero. Las células fueron resuspendidas en Iscoves con suero humano (n°A113, Quidel, San Diego, CA) a las concentraciones indicadas. Las células fueron incubadas 60 minutos a 37°C, se lavaron y se resuspendieron en medio de tinción con 0,5 μ g/mL de yoduro de propidio (PI, n°P-16063, Molecular Probes, Eugene OR). Las muestras fueron incubadas 15 minutos a temperatura ambiente a oscuras antes de análisis por citometría de flujo usando un FACsCalibur y software CellQuest (Becton Dickinson) (Figura 5B).

Para determinar la actividad de ADCC de las fracciones SEC, se marcaron células B (10^7 células) linfoblastoides BJAB, Ramos y Daudi con 500 μ Ci/mL de cromato sódico ^{51}Cr durante 2 horas a 37°C en IMDM/10%FBS. Se aislaron PBMCs a partir de sangre entera humana heparinizada por fraccionamiento en gradientes de Medio de Separación de Linfocitos (LSM, ICN Biomedical). Se añadieron muestras de reactivo a medio RPMI con un 10% de FBS y se prepararon cinco diluciones en serie para cada reactivo. Para las combinaciones, los reactivos fueron premezclados y diluidos antes de la adición a los pocillos. Las BJAB marcadas con ^{51}Cr fueron añadidas a (2×10^4 células/pocillo). A continuación se añadieron las PBMCs a (5×10^5 células/pocillo) para una relación final de 25:1 de efectores (PBMC):dianas (BJAB). Las reacciones se prepararon en pocillos cuadruplicados de una placa de 96 pocillos. Las fracciones SEC de TRU-016 se añadieron a los pocillos a una concentración final que oscila entre 10 ng/mL y 20 μ g/mL como se indica en las figuras. Cada serie de datos representa una fracción SEC diferente en los rangos de valoración descritos. Se dejó que las reacciones procedieran durante 6 horas a 37°C en CO_2 al 5% antes de la recolección y el recuento. Se midió el CPM liberado en un Packard TopCounNXT a partir de 50 μ L de sobrenadante de cultivo seco. Se calculó el porcentaje de muerte específica restando (CPM [media de muestras cuadruplicadas] de muestra - liberación espontánea de CPM) / (liberación máxima de CPM - liberación espontánea de CPM) x 100 (Figura 5C).

La Figura 5A muestra las curvas de valoración de las diferentes fracciones SEC que se unen a células Ramos. Todas las moléculas fraccionadas se unieron a CD37 con similares curvas de unión excepto a las mayores concentraciones evaluadas, donde el material HMW exhibió una mejor unión (mayor intensidad de fluorescencia) que un patrón de pA y que las formas de pico dimérico.

También se llevaron a cabo experimentos para determinar si las fracciones SEC de TRU-016 presentaban diferentes niveles de actividad funcional, tal como la muerte celular dirigida mediada por CDC y ADCC. El gráfico mostrado en la Figura 5B indica que solo la fracción multimérica de HMW purificada media en niveles significativos de actividad de CDC contra células B Ramos usando complemento humano. El patrón de pA exhibió algo de actividad de CDC a mayores concentraciones, mientras que la forma de pico dimérico mostró muy poca o ninguna actividad de CDC a todas las concentraciones evaluadas.

Se llevaron a cabo ensayos de ADCC con diluciones en serie de varias fracciones de tamaño de TRU-016 usando células B BAJB marcadas como dianas y PBMC humanas como células efectoras. Las fracciones SEC de TRU-016 estuvieron presentes en los pocillos con una concentración final que oscilaba entre 10 ng/mL y 20 μ g/mL, tal como se indica en la gráfica mostrada en la Figura 5C. Cada serie de datos representa una fracción SEC diferente en los rangos de valoración descritos. Los datos fueron representados como % de muerte específica frente a concentración de proteína. Todas las subfracciones SEC, que incluyen el patrón de pA, HMW o la fracción A2, y el pico dimérico, mediaron una ADCC potente dependiente de dosis contra células diana BJAB. También se obtuvieron resultados similares usando células Ramos como dianas marcadas (datos no mostrados).

Ejemplo 5

Producción de una molécula de unión específica a CD20

Los SMIPs específicos de CD20 se describen en las Publicaciones de Patente de EE.UU. compartidas 2003/133939, 2003/0118592 y 2005/0136049. A continuación se describe la producción de un ejemplo de SMIP específico de CD20, el TRU-015.

El TRU-015 es una proteína recombinante (murina/humana) de cadena sencilla que se une al antígeno CD20. El dominio de unión se basó en una secuencia de anticuerpo CD20 humano disponible públicamente. El dominio de unión está conectado al dominio efector, los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana, a través de una región de bisagra CSS modificada. El TRU-015 existe como dímero en disolución y el dímero tiene un peso molecular teórico de aproximadamente 106.000 daltons. La secuencia de nucleótidos que codifica el TRU-015 y la secuencia de aminoácidos del TRU-015 se establecen respectivamente en las SEQ ID NOs: 3 y 4.

En referencia a la secuencia de aminoácidos fijada en la SEQ ID NO: 4, el TRU-015 comprende la secuencia de clonación de péptido líder 2e12 de los aminoácidos 1-23; la región variable de cadena ligera de CD20 anti-humano murino 2H7 con una sustitución de aminoácido de lisina a serina (VHL11S) en el residuo 11 de la región variable, que se refleja en la posición 34; un ligando asp-gly3-ser-(gly4ser)₂ que comienza en el residuo 129, presentando el ligando una serina adicional al final para incorporar el sitio de restricción SacI para el barajado de casete; la región variable de cadena pesada de CD20 anti-humano murino 2H7, que carece de un residuo de serina en el extremo de la región de cadena pesada, es decir, que cambia de VTSS a VTVS. un dominio Fc de IgG1 humana, que incluye una región de bisagra modificada que comprende una secuencia (CSS), y dominios CH2 y CH3 naturales.

Las células CHO que producen TRU-015 fueron cultivadas en un biorreactor usando medio propietario. El TRU-015 se purificó usando una serie de etapas cromatográficas y de filtración que incluyen un filtro de reducción de virus. A continuación se concentró el material y se formuló con fosfato sódico 20 mM y sacarosa 240 mM, con un pH resultante de 6,0. La composición se filtra antes de llevarse a viales de vidrio con una concentración de 10 mg/mL. Cada vial de vidrio contenía 5 mL de TRU-015 (50 mg/vial).

Ejemplo 6

Las combinaciones de TRU-016 con TRU-015 o Rituxan aumentan sinérgicamente la apoptosis en células B

Se llevaron a cabo experimentos que examinan el efecto de SMIPs dirigidos a células B sobre la apoptosis de la línea de células B. Se evaluó cada SMIP individualmente y después en combinación. Las muestras fueron analizadas a 24 y 48 horas tras el inicio de las reacciones de incubación. Se llevó a cabo un análisis de Anexina/PI como se indica a continuación: se incubaron células BJAB (cortesía de Ed Clark, Universidad de Washington), Ramos (ATCC n° CRL-1596) y Daudi 24 ó 48 horas a 37°C en CO₂ al 5% en medio completo de Iscoves (Gibco) con FBS al 10% a 3 X 10⁵ células/mL y 20 µg/mL de proteína SMIP. Adicionalmente, se añadieron 20 µg/mL de IgG anti-humana de cabra a las reacciones con el objetivo de reticular reactivos sobre la superficie celular. A continuación las células fueron teñidas con Anexina V-FITC y yoduro de propidio usando el Kit I de detección de apoptosis BD de Pharmigen (n°556547), y se procesaron según las instrucciones del kit. Resumidamente, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y resuspendidas en "tampón de unión" a 1X10⁶ células/mL. A continuación se tiñeron cien microlitros de las células en tampón de unión con 5 µL de Anexina V-FITC y 5 µL de yoduro de propidio. Las células fueron sometidas suavemente a vórtice e incubadas a oscuras a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se añadieron cuatrocientos microlitros de tampón de unión a cada muestra. Después fueron leídas y analizadas en un instrumento FACsCalibur (Becton Dickinson) usando el software Cell Quest (Becton Dickinson).

La Tabla 2 presentada a continuación muestra que, en presencia de reticulación, el tratamiento con TRU-016 tiene un efecto más significativo sobre la apoptosis de líneas celulares que el TRU-015 solo, aunque ambas moléculas cuando se usan solas inducen algo de apoptosis. El incremento varía dependiendo de la línea celular.

TABLA 2

BJAB	Positivo de Anexina V	
Sin SMIP	17,5	
SMIP CD20	27	
SMIP CD37	30,6	
SMIP CD19	29,1	
SMIP CD20+CD37	41	
SMIP CD20+CD19	37,1	
SMIP CD37+CD19	35,3	

BJAB	Positivo de Anexina V	
		más GMA
Ramos	Positivo de Anexina V	Positivo de Anexina V
células solas	3	3,3
MAb CD20	1,4	3,1
MAb CD37	18,3	8,7
MAb CD19	3,7	3,1
MAb CD40	3,9	8,3
CD20+CD37	32,3	35,7
CD20+CD19	5	10,5
CD20+CD40	5,7	19,4
CD19+CD37	26,9	50
CD19+CD40	8,2	18,4

Ejemplo 7

Combinaciones de TRU-016 con anticuerpos o SMIPs específicos de CD20 aumentan de forma sinérgica la CDC

Se llevaron a cabo experimentos para determinar la actividad de CDC de las combinaciones de TRU-016 con anticuerpos o SMIPs específicos de CD20 contra células B. La cantidad de reactivos elegida para los experimentos de combinación fue de 0,5 µg/mL de TRU-016 mientras que la de TRU-015 también fue de 0,5 µg/mL. La concentración de rituxan fue normalmente de 0,04-0,06 µg/mL debido a su mayor actividad en experimentos de CDC con un solo reactivo. En algunos experimentos, la concentración de reactivo CD20 se mantuvo constante en una concentración por debajo de la óptima, mientras que la concentración de TRU-016 fue variada para explorar los niveles mínimos de reactivo dirigido a CD37 requeridos para observar efectos de aumento en la CDC.

Las células fueron suspendidas en Iscoves (n°12440-053, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) a 5 x 10E5 células/pocillo en 75 µL. Se añadió TRU-016 (75 µL), TRU-015, rituxan o combinaciones de dichos reactivos a las células al doble de la concentración indicada. Se dejaron proceder las reacciones de unión durante 45 minutos antes de centrifugación y lavado en Iscoves libre de suero. Las células fueron resuspendidas en Iscoves con suero humano (n°A113, Quidel, San Diego, CA) a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Las células fueron lavadas mediante centrifugación y resuspendidas en 125 µL de PBS con FBS al 2% (n°16140-071, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY), medio de tinción. Las células fueron transferidas a grupos de tubos FACS (n°4410, CoStar, Corning, NY) y se añadieron 125 µL de medio de tinción con 5 µL de yoduro de propidio (PI, n° P-16063, Molecular Probes, Eugene OR). Las muestras fueron incubadas 15 minutos a temperatura ambiente a oscuras antes de análisis por citometría de flujo usando un FACsCalibur y software CellQuest (Becton Dickinson).

La Figura 6 muestra que para concentraciones por debajo de la óptima para matar como un agente individual, el TRU-015 y el rituxan exhiben altos niveles de actividad de CDC cuando se combinan con el TRU-016. El TRU-016 solo no consiguió mediar en CDC a menos que hubiera presentes agregados. El agotamiento de C1 q de las reacciones da como resultado la eliminación de toda la actividad de CDC observada.

La Figura 7 muestra un experimento de combinación llevado a cabo con células B DHL-4. La adición de TRU-016 a las reacciones de CDC da como resultado un desplazamiento a la baja de la curva de muerte de TRU-015, lo que demuestra una muerte más efectiva a cada concentración evaluada incluso aunque el TRU-016 exhibe menos actividad o ninguna actividad.

La Figura 8 muestra otro experimento de CDC en el que los reactivos de muestra se mezcla en las siguientes proporciones: 0,5 µg/mL de TRU-015, 0,5 µg/mL de TRU-016 y 0,06 µg/mL de rituxan. Nuevamente, los agentes individuales se usan en concentraciones inferiores a las óptimas a fin de observar efectos de aumento en la presencia de TRU-016. Para TRU-015 y rituxan, el TRU-016 potencia el nivel de muerte de CDC cuando se añade a los ensayos.

Las Figuras 9 y 10 muestran representaciones gráficas de los datos correspondientes a ensayos CDC en los que la concentración de TRU-015 o de rituxan se mantuvo constante y la concentración de TRU-016 se aumentó. De

nuevo, la actividad de CDC fue mayor cuando se añadió TRU-016 a las reacciones, pero el aumento de la concentración de TRU-016 de 2,5 µg/mL a 0,5 µg/mL no aumentó significativamente la muerte mediada por CDC en dichos experimentos.

Ejemplo 8

5 El TRU-016 aumenta la actividad de ADCC y CDC de anticuerpos y SMIPs específicos de CD20

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si las combinaciones de SMIP TRU-016 con anticuerpos o SMIPs específicos de CD20 podrían aumentar la actividad de ADCC y CDC contra dianas de células B.

Se marcaron células B (10E7 células) linfoblastoides BJAB, Ramos y Daudi con 500 µCi/mL de cromato sódico ⁵¹Cr durante 2 horas a 37°C en IMDM/10%FBS. Las células BJAB marcadas fueron lavadas tres veces en RPMI/FBS al 10% y resuspendidas a 4x10E5 células/mL en RPMI. Se obtuvo sangre entera heparinizada de donantes domésticos anónimos y se obtuvieron PBMC aisladas por fraccionamiento con gradientes de Medio de Separación de Linfocitos (LSM, ICN Biomedical). Se recolectaron las capas leucocitarias y se lavaron dos veces en RPMI/FBS al 10% antes de resuspender en RPMI/FBS al 10% en una concentración final de 3 x 10E6 células/mL. Las células fueron contabilizadas mediante exclusión de azul de tripano usando un hemacitómetro antes de ser usadas en ensayos posteriores. Las muestras reactivas se añadieron a medio RPMI con FBS al 10% a 4 veces la concentración final y se prepararon cinco diluciones en serie de cada reactivo. Para las combinaciones, los reactivos fueron premezclados y diluidos antes de la adición a los pocillos. Dichos reactivos se añadieron entonces a placas de fondo en U de 96 pocillos a 50 µL/pocillo para las concentraciones finales indicadas. Las células BJAB marcadas con ⁵¹Cr se añadieron a las placas a 50 µL/pocillo (2 x 10E4 células/pocillo). Entonces se añadieron las PBMCs a las placas a 100 µL/pocillo (3 x 10E5 células/pocillo) para una proporción final de 15:1 de efectores (PBMC):dianas (BJAB).

Los efectores y las dianas se añadieron al medio solas para medir la muerte de ruido de fondo. Las BJAB marcadas con ⁵¹Cr se añadieron al medio solas para medir la liberación espontánea de ⁵¹Cr y a medio con NP40 al 5% (nº28324, Pierce, Rockford, IL) para medir la máxima liberación de ⁵¹Cr. Las reacciones se prepararon en pocillos cuadruplicados de una placa de 96 pocillos. Los SMIPs se añadieron a los pocillos a una concentración final que oscila entre 12 ng/mL y 1 µg/mL como se indica en las figuras. Para las combinaciones de SMIP, los reactivos fueron mezclados antes de la adición a los pocillos. Cada serie de datos representa un SMIP individual diferente o una combinación en los rangos de valoración descritos. Se dejó que las reacciones procedieran durante 6 horas a 37°C en CO₂ al 5% antes de la recolección y el recuento. A continuación se transfirieron cincuenta µL del sobrenadante de cada pocillo a una Placa Luma 96 (nº6006633, Perkin Elmer, Boston, Mass) y se secaron durante una noche a temperatura ambiente. Se midió el CPM liberado en un Packard TopCounNXT. Se calculó el porcentaje de muerte específica restando (CPM {media de muestras cuadruplicadas} de muestra - liberación espontánea de CPM) / (liberación máxima de CPM - liberación espontánea de CPM) x 100.

Los datos fueron representados como % de muerte específica frente a concentración de SMIP. En cada figura se indica la proporción de efector a diana, y también se indica la línea de células diana. Las Figuras 11, 12 y 13 muestran datos correspondientes a experimentos con diferentes líneas celulares (BJAB, Daudi y Ramos) en los que se usó el mismo donante.

En las Figuras 14 y 15 (rituxan + TRU-016) y en las Figuras 16 y 17 (TRU-015 + TRU-016) se presentan los datos correspondientes a experimentos en los que la línea celular diana usada fue BJAB. La muerte específica observada para todas las combinaciones fue mayor que para cualquier reactivo solo a la misma concentración; lo que indica que los SMIPs dirigidos a CD20 y CD37 aumentan la muerte mediada por los demás, aunque el efecto de aumento no es completamente aditivo.

Por tanto, el TRU-016 puede potenciar la muerte de células B mediada por ADCC de SMIP específico de CD20 o del anticuerpo específico de CD20.

Se diseñaron experimentos iniciales para explorar los efectos de las combinaciones de TRU-016 con anticuerpos dirigidos a CD20 para determinar las cantidades relativas de cada reactivo a usar de tal modo que la sinergia en la CDC pudiera ser detectable. Se suspendieron células Ramos en IMDM, y se añadió TRU-016, Rituxan, o combinaciones de dichos reactivos a las células a las concentraciones finales indicadas en la Figura 18. Se dejaron proceder las reacciones de unión durante 45 minutos antes de centrifugación y lavado en Iscoves libre de suero. Las células fueron resuspendidas en Iscoves con NHS al 10%. Las células se incubaron durante 60 minutos a 37°C. En los experimentos mostrados en la Figura 18 A-C, las células fueron lavadas por centrifugación y resuspendidas en medio de tinción que contenía 0,5 µg/mL de yoduro de propidio (PI, nºP-16063, Molecular Probes, Eugene OR). Las muestras fueron incubadas 15 minutos a temperatura ambiente a oscuras antes de análisis por citometría de flujo usando un FACScalibur y software CellQuest (Becton Dickinson).

El pico de dímero de TRU-016 más altamente purificado es un mediador pobre de la CDC cuando se usa solo, tal como se muestra en la Figura 18A a través de una curva de dosis-respuesta plana incluso a altas concentraciones. Debido a que los reactivos dirigidos a CD20 fueron inductores eficaces de actividad de CDC, eran deseables cantidades no saturantes de los reactivos dirigidos a CD20 en los experimentos de combinación, de tal modo que la sinergia entre los reactivos pudiera ser detectada. A partir de estos estudios iniciales, la cantidad habitual de reactivo

elegida para los experimentos de combinación fue de 0,5 µg/mL o de 2 µg/mL de TRU-016. La concentración de Rituxan fue normalmente de 0,04-0,06 µg/mL debido a su mayor actividad en los experimentos de CDC como reactivo individual. En algunos experimentos, la concentración de reactivo CD20 se mantuvo constante en una concentración por debajo de la óptima, mientras que la concentración de TRU 16 fue variada para explorar los niveles mínimos de reactivo dirigido a CD37 requeridos para observar efectos de aumento en la CDC. Por tanto, el TRU-016 solo no consiguió mediar en CDC a menos que hubiera presentes agregados.

La Figura 18B muestra un gráfico del porcentaje de células vivas (PI negativas) observadas en el rango de valoración indicado (0,06-0,5 µg/mL) cuando se usa Rituxan solo o en combinación con TRU-016 a 2,5 µg/mL. El Rituxan, cuando se utiliza en un intervalo de dosis por debajo de la óptima para matar como reactivo individual, exhibe mayores niveles de actividad de CDC a todas las concentraciones cuando se combina con TRU-016 (Figura 18B). El agotamiento de C1q de las reacciones da como resultado la eliminación de toda la actividad de CDC observada (Figura 3B).

En la Figura 18C, las muestras también se incubaron con FTIC anti-C1q durante 45 minutos en hielo antes del análisis por citometría de flujo. La ventana de linfocitos estaba en las células comprometidas. El porcentaje de células en dicha ventana aumentó al aumentar la concentración de Rituxan, y se representó la MFI relativa para dicha población de células. La Figura 18C muestra los resultados de un experimento de CDC en el que las muestras reactivas se mezclaron en las siguientes proporciones: 0,5 µg/mL para TRU-016, y concentraciones de Rituxan que oscilan entre 0,06 µg/mL y 0,5 µg/mL, y las células teñidas con PI antes de la citometría de flujo. Los resultados muestran un aumento dependiente de dosis en MFI al aumentar la dosis de Rituxan. La adición de formas diméricas de TRU-016 dio como resultado un aumento adicional de la MFI para todas las concentraciones de Rituxan. Se llevó a cabo una serie similar de ensayos de CDC, manteniendo constante la concentración de Rituxan y aumentando la concentración de TRU-016. Nuevamente, la actividad de CDC fue mayor cuando se añadió TRU-016 a las reacciones de Rituxan; pero el aumento de la concentración de TRU-016 desde 2,5 µg/mL a 0,5 µg/mL no aumentó significativamente la muerte mediada por CDC en estos experimentos (datos no mostrados).

Las proteínas de Rituxan y TRU-016 usadas individualmente y en combinación una con la otra se compararon en términos de actividad de CDC *in vitro* usando un rango de concentración similar al usado para los ensayos de CDC. La Figura 18D muestra los resultados de un ensayo de ADCC con dianas de células Ramos y células efectoras PBMC humanas a una relación efector a diana de 25:1, usando TRU-016 o Rituxan, solos o en combinación uno con el otro en los rangos de concentración indicados. Se obtuvieron datos similares con una proporción efector:diana de 12,5:1. Tanto la forma dimérica del TRU-016 como el Rituxan median en niveles significativos de ADCC contra células Ramos que expresan los antígenos diana CD20 y CD37; sin embargo, la combinación de los dos reactivos no da como resultado un aumento significativo del nivel de muerte.

Ejemplo 9

El TRU-016 induce apoptosis en células B

Se llevaron a cabo experimentos que examinan el efecto del TRU-016 en la apoptosis de la línea de células B. Se llevaron a cabo ensayos iniciales de los efectos sobre la apoptosis de moléculas de TRU-016 dirigidas a diferentes receptores de células B diferentes usando material purificado con proteína A que todavía contenía agregados de orden superior. Después de un tratamiento de 24 horas con anticuerpos de CD37 o moléculas diseñadas de TRU-016, se observaron patrones similares de aumento de apoptosis en experimentos múltiples usando los porcentajes de células positivas en anexina V como medida de la actividad apoptótica y ambas células B, Ramos y BJAB, como dianas de unión (datos no mostrados).

La Figura 19A demuestra que la apoptosis se ve incrementada significativamente tras incubación de líneas de células B con TRU-016 no fraccionado. La Figura 19A muestra una gráfica punteada de la tinción con PI-anexina V de células Ramos tras incubación durante 24 horas con el TRU-016 (10 µg/mL). El % de células doble positivas para anexina V-PI aumentó de 11,3 % de la población total a 32,8%, y el % de células positivas para anexina V y negativas para PI aumentó de 8,5% a 19,7%, lo que indica que la apoptosis se induce tras exposición a TRU-016. Se obtuvieron datos similares cuando se usaron células Ramos o BJAB como dianas de unión en estos ensayos.

Se llevaron a cabo otros experimentos que examinan el efecto del TRU-016 sobre la apoptosis de la línea de células B usando la forma dimérica más altamente purificada del TRU-016 (Figura 19B). Las muestras fueron analizadas a 24 y 48 horas tras el inicio de las reacciones de incubación. Se realizó un análisis de Anexina/PI en varios tipos celulares usando 20 µg/mL de proteína TRU-016. Debido a que la apoptosis se redujo usando la forma dimérica del TRU-016, se añadieron 20 µg/mL de IgG anti-humana de cabra a las reacciones con el objetivo de reticular los reactivos sobre la superficie celular. A continuación se tiñeron las células con Anexina V-FTIC y yoduro de propidio. Los datos mostrados en la Figura 19B demuestran que el pico dimérico de TRU-016 indujo la apoptosis de células Daudi tras 24-48 horas, pero que la presencia de un agente de reticulación tal como IgG anti-humana da como resultado un aumento significativo en el nivel de apoptosis dirigida a CD37.

También se llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto de TRU-016 en células B humanas normales en cultivo usando PBMCs humanas. Las Figuras 20A y 20B muestran los resultados de uno de estos experimentos, con

gráficos en columnas del porcentaje de linfocitos positivos en CD19 y CD40 (células B) presentes en cultivos de PBMCs tratados durante 48-72 horas solo con medio, TRU-016 o Rituxan.

Se aislaron PBMCs humanas a partir de sangre entera mediante centrifugación de densidad LSM. Las células fueron incubadas durante 48 ó 72 horas con 1 µg/mL de Rituxan o TRU-016. Una porción de la reacción de incubación se recolectó a 48 horas y de nuevo a 72 horas después del inicio del experimento. Las PBMCs se lavaron y se incubaron con FITC anti-CD19, FITC anti-CD40 o FITC anti-CD3 durante 45 minutos en hielo. El porcentaje de tinción de linfocitos totales con estos reactivos se tabuló a continuación y se comparó con las muestras de PBMC incubadas en condiciones similares pero sin los reactivos de ensayo, y teñidas como las muestras tratadas. Las Figuras 20A y B muestran gráficos en columnas de la fracción de la población de linfocitos totales (%) que proporcionan una señal FACS positiva tras 48 y 72 horas con los reactivos indicados. La Figura 20C muestra un gráfico compuesto de un experimento similar, que muestra el porcentaje de reducción del número original de linfocitos que expresan el antígeno CD indicado (es decir, positivos en CD19, CD40 o CD3) tras incubación de PBMCs con TRU-016 (a 1 µL/mL) durante 24 y 72 horas.

En presencia de reticulado, el tratamiento con la forma dimérica de TRU-016 o Rituxan dio como resultado una reducción en el porcentaje de linfocitos B en cultivos de PBMC, medido a través de la tinción positiva para CD19 y CD40. Aunque el porcentaje de linfocitos B en cultivo fue bajo al finalizar el experimento, el co-cultivo con Rituxan o TRU-016 rebajó el número de linfocitos positivos de CD19 y CD40 en el cultivo de PBMC en aproximadamente 1,5-2 veces tras 48 horas, y en más de tres veces tras 72 horas. Este patrón general de agotamiento de células B tras 48-72 horas fue reproducible en todos los cultivos de PBMC normales evaluados, independientemente del porcentaje inicial de partida de linfocitos B en estos cultivos, que osciló entre aproximadamente 3% y hasta el 7% del total de linfocitos, dependiendo de la muestra.

La Figura 20C muestra un gráfico en columnas del porcentaje de agotamiento de linfocitos B en comparación con linfocitos T en cultivos de PBMC a corto plazo incubados con TRU-016 durante 24 a 72 horas. Estos datos indican que el TRU-016 es capaz de un agotamiento específico de linfocitos B positivos en CD37 procedentes de cultivos de sangre periférica normal, y que el bajo nivel de unión de TRU-016 a linfocitos no B (Figura 1C) es insuficiente para mediar en un agotamiento significativo de dichos linfocitos procedentes de la población celular.

Ejemplo 10

Las combinaciones de TRU-016 y Rituximab reducen significativamente el volumen tumoral en un modelo de xenoinjerto tumoral murino

Se llevaron a cabo estudios de xenoinjerto tumoral de ratón explorando terapias de combinación usando ratones nude (Harlan) y líneas tumorales humanas Ramos o Daudi. Las células tumorales Ramos o Daudi fueron cultivadas en matraces T150 en IMDM/FBS al 10% hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. Se usaron cinco millones (5×10^6) de células como inóculo tumoral por ratón. Las células fueron inyectadas subcutáneamente en el costado derecho usando PBS en un volumen total de 0,1 mL o $5,0 \times 10^7$ /mL. Se permitió que los ratones nude desarrollaran tumores y se clasificaron en grupos en base al tamaño/volumen del tumor. Para cada grupo de tratamiento se usaron 12 ratones con un volumen tumoral medio de aproximadamente 222 mm³ (rango = 152-296 mm³). También se usaron algunos volúmenes tumorales medios que oscilaban entre 237 y 251 mm³. Los animales fueron inyectados intravenosamente (IV) en los días 0, 2, 4, 6 y 8 con uno de los siguientes reactivos: POI (pico de interés) GPC de TRU-016, 200 µg/ratón; rituxan, 200 µg/ratón, o IgG humana (control) a 200 ó 400 µg/ratón como reactivos individuales, o como las siguientes combinaciones de reactivos: Rituxan + TRU-016 a 100 µg cada uno por ratón; o Rituxan + TRU-016 a 200 µg cada uno por ratón. Se midió el volumen tumoral diariamente con calibre hasta la finalización del experimento (sacrificio o regresión). Se representó el volumen tumoral en función del tiempo de tratamiento para cada animal y los resultados también se promediaron dentro de cada grupo.

También se llevaron a cabo estudios similares usando tumores más pequeños, con los ratones clasificados en grupos con menores volúmenes tumorales medios que oscilan entre 153 y 158 mm³, y con tumores más grandes pero usando células Daudi en lugar de células Ramos. Estos estudios fueron llevados a cabo en una instalación de animales acreditada por AAALAC y con un programa de uso de animales que sigue las guías del "Institutional Animal Care and Use Committee" (IACUC).

La Figura 21 representa gráficamente la eficacia del TRU-016 en comparación con hulgG, rituxan y las combinaciones a 100 µg y 200 µg de promedio en cada grupo de 12 animales. El volumen tumoral se representó en función del tiempo tras tratamiento con la(s) inyección(es) IV. El volumen tumoral promedio después de tratamiento con TRU-016 fue menor que el observado usando el control negativo (hulgG). Cuando se representa el % de supervivencia o el % de animales sin tumor, la terapia de combinación de la dosis más alta exhibió la mayor actividad antitumoral en este modelo tumoral *in vivo*. Sin embargo, a la menor dosis (100 µg de cada uno), la terapia de combinación no fue tan efectiva como cada reactivo individual a una dosis mayor.

Estos datos indican que la terapia con TRU-016, cuando se usa en combinación con rituxan en las dosis apropiadas, tendrá una mayor eficacia en el tratamiento de tumores de pacientes que la terapia de rituxan solo.

Ejemplo 11

El TRU-016 reduce el volumen tumoral y aumenta la supervivencia en un modelo de xenoinjerto tumoral murino

Se llevaron a cabo estudios de xenoinjerto tumoral de ratón usando ratones nude (Harlan) y líneas tumorales humanas Ramos o Daudi. Se llevaron a cabo tres estudios diferentes en base al tipo de tumor y el tamaño de tumor en el momento del tratamiento con el reactivo TRU-016 u otro reactivo de ensayo. Se cultivaron células tumorales Ramos o Daudi y se inyectaron subcutáneamente células (5×10^6) en el costado derecho para inocular cada ratón tratado con el tumor. Se permitió que los ratones nude desarrollaran tumores y se clasificaron en grupos en base al tamaño/volumen del tumor. En el primer estudio, para cada grupo de tratamiento, se usaron 12 ratones con un volumen tumoral medio de 155-237 mm³. Los animales fueron inyectados intravenosamente (IV) en los días 0, 2, 4, 6 y 8 con uno de los siguientes reactivos: Rituximab, 200 µg/ratón; pico dimérico GPC de TRU-016, 200 µg/ratón; o IgG humana (control), 400 µg/ratón. Se midió el volumen tumoral diariamente con calibre hasta la finalización del experimento (sacrificio o regresión). Se representó el volumen tumoral en función del tiempo de tratamiento para cada animal y los resultados también se promediaron dentro de cada grupo. En la Figura 22A se muestran los promedios de grupo, mientras que la Figura 22B muestra una comparación de los datos de porcentaje de supervivencia para cada grupo de ratones en función del tiempo.

La Figura 22A muestra la eficacia de TRU-016 en comparación con hulgG y Rituxan en el modelo tumoral de Ramos, promediada para cada grupo de 12 animales. El volumen tumoral se representó en función del tiempo tras tratamiento con la(s) inyección(es) IV. El volumen tumoral promedio después de tratamiento con TRU-016 fue menor que el observado usando el control negativo (hulgG). La Figura 22B representa gráficamente las curvas de supervivencia para los diferentes grupos de tratamiento, comparando hulgG, Rituxan y TRU-016. La administración de TRU-016, que utiliza el modelo tumoral de Ramos más demandante con un volumen tumoral de línea base incrementado, dio como resultado una inhibición de la tasa de crecimiento tumoral respecto a la IgG humana (datos no mostrados). La administración de TRU-016 a ratones con los menores tumores de Ramos dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral y aumentó los tiempos de supervivencia medios.

Ejemplo 12

El TRU-016 no afecta a la actividad de CDC de otros receptores de superficie de células B

Para determinar si la molécula de TRU-016 aumenta el nivel de actividad de CDC resultante del tratamiento con anticuerpos de otros receptores de superficie de células B, además del CD20, tal como MHCII, CD19, CD80/86 y CD40, se llevó a cabo un panel de experimentos similar a los descritos antes para las combinaciones directas de CD20-CD37.

Se añadieron células Ramos a pocillos con medio completo de Iscoves con FBS al 10%. Los MAbs (reactivo B: HD37-anti CD19, reactivo C: 9.4-anti-CD45), proteína de fusión (reactivo D: CTLA-4 mulg-IgG2a, Ancell n°501-820), y fluido ascítico (reactivo A: HB10a-anti-MHCII), fueron añadidos a las diluciones indicadas (ver Figura 23) y se realizaron reacciones por duplicado con y sin Rituximab (a 0,05 µg/mL) o se añadió TRU-016 (a 2 µg/mL). Las reacciones fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C. Las células fueron lavadas y se añadió NHS a una concentración final del 10% en medio libre de suero. Las células fueron incubadas durante 90 minutos a 37°C con la fuente de complemento. Las células fueron lavadas; se añadió yoduro de propidio a una concentración final de 0,5 µg/mL en PBS; las células fueron incubadas a oscuras a temperatura ambiente durante 15 minutos; y después las células fueron evaluadas mediante citometría de flujo. Cada gráfico de los paneles A-D de la Figura 23 representa el % de células positivas de PI en los rangos de valoración indicados.

En general, los datos indican que no se produjo una diferencia significativa en el nivel de actividad de CDC cuando los anticuerpos dirigidos a estos receptores se usaron solos o en combinación con el TRU-016 (Figura 23 A-D). Puede haber un ligero incremento en los niveles de CDC para los reactivos dirigidos a CD19 y CD45 cuando se usan con TRU-016 en concentraciones por debajo de las óptimas. Sin embargo, las diferencias en los niveles de CDC no son tan significativas como las observadas para la combinación CD20-CD37. Además del aumento de CDC cuando se usan en combinación los reactivos dirigidos a CD20 y CD37, parece que se produce un aumento en el nivel de muerte observado usando combinaciones de anti-clasell (HB10a), anti-CD19, anti-CD45 (9.4) o CTLA4Ig con Rituxan en dosis por debajo de la óptima.

Ejemplo 13

El TRU-016 no aumenta la actividad de CDC de otros receptores diana, que incluyen MHCII, CD19, CD80/86 y CD40

Para determinar si la molécula de TRU-016 aumenta el nivel de actividad de CDC resultante del tratamiento con anticuerpos de otros receptores de superficie de células B, además del CD20, se llevó a cabo un panel de experimentos similar a los descritos antes para las combinaciones directas de CD20-CD37 (véase el Ejemplo 8). Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 23. En general, no se produjo una diferencia significativa en el nivel de actividad de CDC cuando los anticuerpos dirigidos a estos receptores se usaron solos o en combinación con el TRU-016. Los niveles de CDC aumentaron ligeramente en respuesta a los reactivos dirigidos a

CD19 y CD45 cuando se usan con TRU-016 en concentraciones por debajo de la óptima. Sin embargo, las diferencias en los niveles de CDC no fueron tan significativas como las observadas para la combinación CD20-CD37 (véase el Ejemplo 8). Además del aumento de CDC cuando se usan en combinación los reactivos dirigidos a CD20 y CD37, parecía que se producía un aumento en el nivel de muerte observado usando combinaciones de anti-MHCII (HB10a), anti-CD19, anti-CD45 (9.4) o CTLA4Ig con Rituxan en dosis por debajo de la óptima.

Ejemplo 14

El TRU-016 aumenta la supervivencia en un modelo de xenoinjerto tumoral murino

Se llevaron a cabo estudios de xenoinjerto tumoral de ratón más allá de los descritos en el Ejemplo 11 para examinar la eficacia del TRU-016 para aumentar la supervivencia a largo plazo usando ratones nude (Harlan) y líneas celulares tumorales humanas Ramos o Daudi.

Las células tumorales Ramos y Daudi se cultivaron por separado y se inyectaron las células (5×10^6) subcutáneamente en el flanco derecho de los ratones para iniciar la formación de xenoinjertos tumorales de ratón. Tras desarrollarse los tumores, los ratones fueron clasificados en grupos en base al tamaño/volumen del tumor (día 0). Los animales fueron inyectados intravenosamente (IV) en los días 0, 2, 4, 6 y 8 con uno de los siguientes reactivos: Rituximab, 200 µg/ratón; TRU-016, 200 µg/ratón; rituximab + TRU-016 a 100 ó 200 µg/ratón; o IgG humana (control), 400 µg/ratón. Se midió el volumen tumoral tres veces por semana con calibre hasta la finalización del experimento (sacrificio o regresión). Se representó el volumen tumoral en función del tiempo de tratamiento para cada animal y los resultados se promediaron dentro de cada grupo. La Figura 24 muestra el porcentaje de supervivencia en ratones con tumores Ramos (hasta 90 días) tras el tratamiento con TRU-016, rituximab o una combinación de los mismos. El tratamiento de combinación con TRU-016 + rituximab aumentó significativamente el tiempo de supervivencia medio frente al tratamiento con terapia de agente individual solo. Las Figuras 25 y 26 muestran el porcentaje de supervivencia en ratones con tumores Daudi (hasta 90 días) tras el tratamiento con TRU-016 o rituximab. el tratamiento con TRU-016 aumentó el tiempo de supervivencia medio en tumores Daudi establecidos (Figura 25). El TRU-016 fue más efectivo que el rituximab para mantener la supervivencia en ratones con tumores Daudi (Figura 26).

La administración de TRU-016 como agente individual en ratones con tumores de Ramos establecidos demostró una inhibición del crecimiento tumoral y mejoró los tiempos de supervivencia equivalentes a rituximab administrado como agente individual, y fue superior a los ratones tratados con control de HulgG. Los datos agrupados de 3 experimentos demostraron que la terapia de combinación de TRU-016 y rituximab dio como resultado una mejora estadísticamente significativa en el tiempo de supervivencia en comparación con las monoterapias de TRU-016 ($p = 0,028$) o rituximab ($p = 0,045$). Las regresiones tumorales completas también se vieron potenciadas para los grupos de combinación de TRU-016 y rituximab. El cuarenta y dos por ciento del grupo de combinación de TRU-016 + rituximab 200 µg fue capaz de alcanzar una regresión completa a largo plazo en sus tumores en comparación con el 20% de tasa de regresión tumoral en ratones tratados con TRU-016 ó rituximab solos (véase la Tabla 3 y la Figura 24).

Tabla 3. Supervivencia tras tratamiento en tumores de Ramos establecidos

	Porcentaje de ratones sin tumor en el día 90	Tiempo de supervivencia medio (Días)
TRU-016 + rituximab (200 µg)	42	31
TRU-016 + rituximab (100 µg)	25	24
TRU-016 (200 µg)	20	16
Rituximab (200 µg)	20	17
HulgG	0	10

Se observó una reducción del crecimiento tumoral y una mejora del tiempo de supervivencia tras el tratamiento con TRU-016 en el modelo de xenoinjerto tumoral de Daudi (véase la Tabla 4 y las Figuras 25 y 26). La administración de TRU-016 potenció significativamente el tiempo de supervivencia en comparación con el grupo de control. También se observó un aumento en el porcentaje de ratones libres de tumor con el tratamiento con SMIP-016 en este modelo en comparación con los grupos de control y de rituximab.

TABLA 4. Supervivencia tras tratamiento en tumores de Daudi establecidos

	Porcentaje de ratones sin tumor en el día 90	Tiempo de supervivencia medio (Días)
TRU-016 (100 µg)	25	24
Rituximab (100 µg)	0	17
HulG	0	15

El tratamiento con SMIP dirigido a CD37 (TRU-016) es tan efectivo como la monoterapia de rituximab para reducir el volumen tumoral y para aumentar el tiempo de supervivencia en el modelo de xenoinjerto tumoral de Ramos. La terapia de combinación de TRU-016 + rituximab demostró un beneficio potenciado para reducir el volumen tumoral y para mejorar significativamente el tiempo de supervivencia en comparación con las monoterapias de rituximab o TRU-016 en el modelo de xenoinjerto tumoral de Ramos. En el modelo de xenoinjerto de Daudi, los ratones tratados con TRU-016 demostraron un aumento estadísticamente significativo en el tiempo de supervivencia medio en comparación con los controles de HulG. El tratamiento con rituximab no extendió los tiempos de supervivencia con respecto a los ratones de control. Estos datos resaltan la eficacia de una terapia dirigida a CD37 en estos modelos de xenoinjerto de NHL.

Ejemplo 15

El TRU-016 potencia la muerte celular inducida por Fludarabina en células CLL *in vitro*

La fludarabina es un fármaco quimioterapéutico usado en el tratamiento de malignidades hematológicas. La fludarabina es un análogo de purina que inhibe la síntesis de ADN interfiriendo con la ribonucleótido reductasa y la ADN polimerasa. La fludarabina es activa contra células en división y células en reposo. La fludarabina es altamente efectiva en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL), produciendo mayores tasas de respuesta que agentes alquilantes tales como el clorambucil solo (Rai et al., N. Engl. J. Med. 343: 1750-1757, 2000). La fludarabina se usa en varias combinaciones con ciclofosfamida, mitoxantrona, dexametasona y rituximab en el tratamiento de linfoma indolente y linfoma no de Hodgkins. Sin embargo, también se ha observado resistencia a la fludarabina en tratamientos. La fludarabina induce la apoptosis dependiente de caspasa en células CLL, y la apoptosis mediada por TRU-016 parece ser independiente de la activación de caspasa. El presente estudio examinó el efecto del TRU-016 con la fludarabina sobre células CLL.

Las células fueron tratadas con TRU-016 en dosis que oscilan entre 0,1 y 100 µg/mL y con fludarabina en dosis que oscilan entre 0 y 20 µM (ver la Figura 27). El TRU-016 fue proporcionado por Trubion Pharmaceuticals (Seattle, WA). La fludarabina (F-araA) fue adquirida de SIGMA (St. Louis, MO). El medio RPMI 1640 fue comprado a Invitrogen (Carlsbad, CA). La anexina V marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el yoduro de propidio (IP) fueron adquiridos de BD Pharmingen, San Diego, CA. El bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) fue comprado a Sigma (St. Louis, MO). Las células B-CLL fueron aisladas inmediatamente después de la donación usando centrifugación de gradiente de densidad ficoll (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se incubaron células mononucleares en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal desactivado térmicamente (FBS, Hyclone Laboratories, Logan, UT), L-glutamina 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA), y penicilina (100 U/mL)/estreptomina (100 µg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Para todos los experimentos descritos en la presente memoria se usaron células B-CLL recién aisladas excepto para la tinción superficial. Para las muestras con menos de un 90% de células B, se aplicó una selección negativa para agotar las células no B usando el Kit II de aislamiento de células B (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) o mediante el kit "Rosette-Sep" de Stem Cell Technologies (Vancouver, Columbia Británica, Canadá) según el protocolo sugerido por el fabricante. Se compró la línea celular Raji (línea de células de linfoma humano de Burkitt) a ATCC y se mantuvo en medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FBS, suplementado con penicilina, estreptomina y glutamina. Las células fueron divididas 1:3 cuando la densidad celular alcanzó 1×10^6 /mL. El medio se cambió la noche antes de cada estudio para asegurar que se usaban células frescas.

Las células fueron tratadas *in vitro* como se ha descrito en la presente memoria. Se preparó una dilución en serie 1:4 de fludarabina (44, 11, 2,8, 0,7, 0,17 y 0,04 µM) en una placa de 6 pocillos transfiriendo 2 mL de medio que contiene fármaco al siguiente pocillo que contenía 6 mL de blanco de medio. En una placa de 6 pocillos separada, se preparó una dilución en serie 1:4 de TRU-016 (44, 11, 2,8, 0,7, 0,17 y 0,04 µg/mL) en medio usando el mismo método de dilución. De todas las placas se transfirieron 0,45 mL de medio a un pocillo diseñado de una placa de 48 pocillos para preparar una disolución de fármaco mixta en medio (0,9 mL en total por cada pocillo). A continuación se añadieron las células CLL suspendidas en medio con una densidad de 1×10^7 células/mL (0,1 mL) a los 0,9 mL de medio de cada pocillo para obtener una densidad final de 1×10^6 células/mL. Para las células Raji, la densidad celular final fue de 5×10^4 células/mL. Por tanto, la suspensión celular usada fue de 5×10^5 células/mL. Para los ensayos MTT, se prepararon diluciones en serie de fármaco en placas de 96 pocillos, y se transfirieron a otras placas de 96 pocillos para la incubación con células. El volumen total para incubación es de 200 µL (90 µL de disolución de fludarabina, 90 µL de disolución de TRU-016 y 20 µL de suspensión celular). La viabilidad celular se determinó usando ensayos MTT a 48 h, y la apoptosis se midió usando Anexina V/PI a las 24 h.

Se llevaron a cabo ensayos MTT para medir la viabilidad celular como se ha descrito en la presente memoria. Resumidamente, se sembraron 10^6 células CLL en placas de 96 pocillos. Las células fueron incubadas durante 48 horas. A cada pocillo se añadieron 50 μ L de disolución de trabajo MTT (2 mg/mL, preparada a partir de 5 mg/mL de reactivo de MTT mezclado con RPMI 1640 2:3 v/v), y las células se incubaron durante 8 horas. Las placas fueron sometidas a centrifugación y el sobrenadante se eliminó y se disolvió en 100 μ L de disolución de lisis. Las muestras se midieron con un lector de placas a D.O. 540. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de viabilidad en comparación con el control de medio.

La apoptosis de células CLL tras incubación con anticuerpos se midió usando tinción de anexina V-FTIC/yoduro de propidio (PI) con análisis FACS. Se tiñeron 5×10^5 células en 200 μ L de 1x tampón de unión (BD Pharmingen) con 5 μ L de anexina V (BD Pharmingen) y 5 μ L de PI (BD Pharmingen), y se mantuvieron a oscuras a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de la suspensión con 300 μ L de 1x tampón y se analizaron por citometría de flujo. Se prepararon células sin teñir, células teñidas solo con Anexina V, y células teñidas solo con PI. Para todos los experimentos de citometría de flujo, se llevó a cabo un análisis FACS usando un citómetro Beckman-Coulter EPICS XL (Beckman-Coulter, Miami, FL). Los fluoróforos se excitaron a 488 nm. Se midió la fluorescencia FITC con FL1, mientras que la fluorescencia PI y PE se midió con FL3. Para analizar los datos se aplicó el paquete de software System II (Beckman-Coulter). El número de células contadas se fijó en 10.000 para cada muestra.

Se determinó un efecto sinérgico mediante el uso del método de isoblograma. Para identificar sinergias, se comparó el efecto de un fármaco con el efecto de cada fármaco solo. Esto se basa en la ecuación: $Ca/Ca,b + Cb/Cb,a = CI$, donde Ca y Cb son la concentración de fármaco A y de fármaco B solos, respectivamente, para producir un efecto deseado (p.ej. 50% de muerte celular). $C_{a,b}$ y $C_{b,a}$ son las concentraciones de fármaco A y fármaco B en una combinación, respectivamente, para producir el mismo efecto. CI es el índice de combinación. Se determinaron las concentraciones de fludarabina y TRU-016, que producen un 50% de muerte (IC50) y se muestran en la Figura 27C [IC50 de Fludarabina (I) e IC50 de TRU-016 (II)]. La línea recta entre estos dos puntos en los ejes es la línea de efecto aditivo. Posteriormente, también se determinaron diferentes combinaciones de fludarabina y TRU-016 que alcanzan un 50% de muerte celular a partir del estudio de viabilidad y se representan en el mismo gráfico. Cuando los puntos caen por debajo de la línea aditiva, se indica sinergia. Cuando los puntos se elevan por encima de la línea, se indica antagonismo. Cuando los puntos están en la línea, se indica aditividad.

La Figura 27 muestra que TRU-016 reduce de forma eficaz la viabilidad celular relativa en células tratadas con fludarabina, potenciando con ello el efecto citotóxico de la fludarabina sola. Por tanto, este estudio proporciona evidencias de que el TRU-016 puede ser co-administrado con fludarabina, dando como resultado un aumento de la eficacia (es decir, una reducción sinérgica de células CLL) en el tratamiento de malignidades hematológicas.

Ejemplo 16

El TRU-016 induce citotoxicidad directa en células resistentes a rituximab

Tal como se describe en la presente memoria, el rituximab es un anticuerpo monoclonal usado en el tratamiento de NHL, FCC, MCL, DLCL, SLL y CLL. El presente estudio se realizó para determinar la eficacia del TRU-016 para inducir citotoxicidad directa en células resistentes a rituximab.

Células resistentes a rituximab (1×10^6 células) (Raji 4RH y RL 4RH, suministradas por el Dr. Myron S. Czuczman, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY) fueron tratadas con herceptina (10 μ g/mL), rituximab (10 μ g/mL) o TRU-016 (5 μ g/mL) en presencia de un exceso 5 a 1 de IgG anti-humana de cabra durante 24 horas. Se midió la citotoxicidad directa mediante tinción de anexina/PI y se calculó la viabilidad celular (porcentaje) respecto a células de control (células tratadas con herceptina).

El TRU-016 indujo una mayor toxicidad celular que el rituximab en líneas celulares resistentes a rituximab (ver la Figura 28). Por tanto, el TRU-016 es un agente efectivo para inducir citotoxicidad en células resistentes a rituximab, haciéndolo útil como agente terapéutico en enfermedades que se caracterizan por, o que implican, células resistentes a rituximab, tal como algunas células B.

Ejemplo 17

El TRU-016 induce fosforilación de tirosina en células B CLL CDC19+ primarias

Para determinar cómo induce el TRU-016 señal de transducción en células B, se llevaron a cabo experimentos para examinar el efecto del TRU-016 en la fosforilación de tirosina.

Se suspendieron células CD19+ recién aisladas (~ 50 - 100×10^6) procedentes de pacientes de CLL a una concentración de 5×10^6 /mL de PBS. A continuación las células fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C, 5% de CO₂, con control, trastuzumab (herceptina) o TRU-016 a una concentración final de 5 μ g/mL. Las células fueron precipitadas por centrifugación, se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en PBS fresco al volumen inicial. Se añadió reticulante específico de fragmento Fc anti-humano de cabra (25 μ g/mL) y las células se incubaron durante otros 5 minutos adicionales. Las células volvieron a ser precipitadas por centrifugación, se retiró el sobrenadante y las células fueron lisadas en 1 mL de tampón de lisis RIPA con inhibidores de proteasa y fosfatasa

(Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1% de Triton X-100, 1% de ácido desoxicólico, 0,1% de SDS y EDTA 5 mM, todo concentraciones finales). Se usó cóctel inhibidor de proteasa de Sigma nº cat. P-8340; cóctel inhibidor de fosfatasa de Sigma: cóctel inhibidor de serina/treonina fosfatasa nº cat. P-2850; e inhibidor de tirosina fosfatasa nº cat. P-5726; PMSF (100mM). Los inhibidores se añadieron al tampón de lisis inmediatamente antes de su uso con una dilución 1:100. La concentración de proteína en los lisatos fue cuantificada mediante el método de ácido bicin conínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Las muestras de proteínas de control y tratadas (50 ug de proteína total) fueron separadas mediante electroforesis de gel bidimensional (rango de pH 3-10) (1ª dimensión) y SDS-PAGE al 10% (2ª dimensión). La proteína fue transferida a membranas de nitrocelulosa de 0,2 nm (Schleicher & Schuell, Keene, NH) y se sometió a análisis de inmunotinción usando el clon de anticuerpo de anti-fosfotirosina 4G10 (Upstate Biotechnology), siguiendo un protocolo estándar. Se usó IgG anti-conejo de cabra conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) como anticuerpo secundario. La detección de la fosfoproteína se realizó con sustrato quimioluminiscente (SuperSignal, Pierce Inc. Rockford, IL).

El TRU-016 induce fosforilación de tirosina en células B CLL primarias CD19+, tal como muestra el análisis de gel bidimensional (Figura 29). Por tanto, estos experimentos muestran que un modo en el que actúa el TRU-016 es a través de un mecanismo de fosforilación de tirosina.

Ejemplo 18

Moléculas TRU-016 humanizadas

Tal como se establece en el Ejemplo 1, se describen SMIPs específicos de CD37 (tal como el TRU-016) en la Solicitud de Patente de EE.UU. compartida nº 10/627.556 y en las Solicitudes de Patente de EE.UU. nº 2003/133939, 2003/0118592 y 2005/0136049. Un ejemplo de SMIP específico de CD37, el polipéptido de TRU-016 (SEQ ID NO: 2), se ha producido y se ha descrito en la presente memoria. El presente ejemplo proporciona SMIPs de TRU-016 humanizados.

En la técnica se conocen los anticuerpos humanizados y se discuten en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos nº 2006/0153837. La presente solicitud usa las técnicas implicadas en la humanización de anticuerpos (discutidas más adelante) para humanizar SMIPs, y particularmente para humanizar TRU-016.

Es de esperar que la "humanización" dé como resultado un anticuerpo que sea menos inmunogénico, con una retención completa de las propiedades de unión a antígeno de la molécula original. A fin de retener todas las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo original, la estructura de su sitio de unión a antígeno debería reproducirse en la versión "humanizada". Esto se puede lograr anclando solo CDRs no humanas en dominios estructurales variables y en regiones constantes, con o sin retención de residuos estructurales críticos (Jones et al, Nature 321: 522 (1986); Verhoeven et al, Science 239: 1539 (1988)) o recombinando los dominios no humanos enteros (para preservar las propiedades de ligando-unión), pero "enmascarándolas" con una superficie de tipo humana a través de una sustitución juiciosa de los residuos expuestos (para reducir la antigenicidad) (Padlan, Molec. Immunol. 28:489 (1991)).

Esencialmente, la humanización mediante anclaje de CDR implica recombinar solo las CDRs de un anticuerpo no humano sobre una estructura de región variable humana y una región constante humana. Teóricamente, esto debería reducir sustancialmente o eliminar la inmunogenicidad (excepto si existen diferencias alotípicas o idiotípicas). Sin embargo, se ha publicado que también se puede necesitar preservar algunos residuos estructurales del anticuerpo original (Reichmann et al, Nature, 332: 323 (1988); Queen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10.029 (1989)).

Los residuos estructurales que necesitan ser preservados son susceptibles de identificación a través de modelización con ordenador. Alternativamente, potencialmente se pueden identificar los residuos estructurales críticos mediante comparación de estructuras de sitio de unión a antígeno conocidas (Padlan, Molec. Immun., 31(3): 169-217 (1994)).

Los residuos que afectan potencialmente a la unión a antígeno se distribuyen en varios grupos. El primer grupo comprende residuos que están contiguos a la superficie del sitio de antígeno, que por lo tanto podrían entrar en contacto directo con los antígenos. Estos residuos incluyen los residuos amino-terminales y los adyacentes a las CDRs. El segundo grupo incluye los residuos que podrían alterar la estructura o el alineamiento relativo de las CDRs, tanto por entrar en contacto con las CDRs como por entrar en contacto con otra cadena peptídica del anticuerpo. El tercer grupo comprende aminoácidos con cadenas laterales enterradas que podrían influir en la integridad estructural de los dominios variables. Los residuos de estos grupos se encuentran habitualmente en las mismas posiciones (Padlan, 1994, ver anterior) aunque sus posiciones identificadas pueden diferir dependiendo del sistema de numeración (véase Kabat et al, "Sequences of proteins of immunological interest", 5ª ed., Pub. Nº 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991).

Aunque la presente invención está dirigida a la humanización de SMIPs y no de anticuerpos, el conocimiento sobre anticuerpos humanizados que existe en la técnica es aplicable a los SMIPs según la invención. Algunos ejemplos de moléculas TRU-016 humanizadas se incluyen en la Tabla 5 a continuación.

Para preparar construcciones de TRU-016 humanizadas de la invención, se alinearon las regiones estructurales de ratón del TRU-016 con residuos estructurales VH1 y VH5 humanos para la cadena pesada y VK1 y VK3 para la cadena ligera. Las mejores coincidencias se analizaron para determinar la compatibilidad estructural con las CDRs de las regiones variables de ratón. Aunque había varias combinaciones igualmente compatibles para elegir, nosotros habíamos tenido éxito previamente usando la combinación VK3 (X01668), VH5-51 (Z12373), por lo que los SMIPs anti-CD37 humanizados fueron diseñados usando estas estructuras humanas unidas mediante un ligando 15aa Gly₄Ser ((g4s)3) scFv. La construcción VK3 fue construida con JK1 como coincidencia de FR4 preferida y la VH5 fue construida con JH2 que codifica para FR4, como en construcciones descritas previamente. Los SMIPs fueron contruidos desde cero usando PCR de oligonucleótidos solapantes. Los productos de longitud completa se clonaron en el vector de expresión de SMIP en cuadro con la bisagra de IgG1 humana, CH2 y CH3. Dichos clones fueron verificados en su secuencia, transfectados en células COS-7 evaluados para unión a la línea de linfoma de células B Ramos en medio acondicionado durante 3 días. Con el objetivo de aumentar la humanización, se incorporaron cambios en la CDR1 de la cadena ligera en las posiciones L25, L27 y L28 y fueron bien tolerados, lo que demuestra una actividad de unión igual a la de la molécula humanizada original 019001. Se prepararon construcciones de ADN adicionales de un modo similar para alterar la CDR3 de la región VH incorporando aminoácidos de línea germinal, H100-H102, codificados por varias regiones JH humanas. Las construcciones fueron examinadas para determinar el nivel de expresión y el grado de unión a CD37 en células Ramos.

TABLA 5. Construcciones de TRU-016 humanizadas

Construcción N°	Descripción	Ligando	Bisagra	SEQ ID NO de ADN	SEQ ID NO de AA
019001	Vk3:VH5-51	15aa gly4ser	SSC-P	5	6
019002	Ligando Vk3:VH5-51 (TG-SS)	15aa gly4ser	SSC-P	7	8
019003	Vk3:VH5-51 VH V11S	15aa gly4ser	SSC-P	9.	10
019004	Vk3:VH5-51 VK3, cdr1 (E → Q)	15aa gly4ser	SSC-P	11	12
019005	Vk3:VH5-51 VK3, cdr1 (N → S)	15aa gly4ser	SSC-P	13	14
019006	Vk3:VH5-51 VK3, cdr1 (T → A)	15aa gly4ser	SSC-P	15	16
019010	mVk:VH5-5a	15aa gly4ser	SSC-P	17	18
019011	Vk3:mVH (mutación G-S de ligando)	15aa gly4ser	SSC-P	19	20
019017	Vk3:VH5 VH3 FW1	15aa gly4ser	SSC-P	21	22
019018	mVH:Vk3	15aa gly4ser	SSC-P	23	24
019019	Vk3:mVH (019011 con Líder 2H7)	15aa gly4ser	SSC-P	25	26
019021	mVH:Vk3	15aa gly4ser	SSC-P	27	28
019023	Vk3:mVH (mutación GS4 fija 019011)	15aa gly4ser	SSC-P	29	30
019024	Vk3:mVH (mutación GS4 fija 019011)	15aa gly4ser	SSC-P	31	32
019025	Vk3:VH5 VH3 FW1	15aa gly4ser	SSC-P	33	34
019026	Vk3:VH5 VH3 FW1	15aa gly4ser	SSC-P	35	36
019032	Vk3:VH5 VH3-13 FW1	15aa gly4ser	SSC-P	37	38
019033	Vk3:VH5 VH3-13 FW1	15aa gly4ser	SSC-P	39	40
019034	Vk3:VH5 VH3-13L11S FW1	15aa gly4ser	SSC-P	41	42
019035	Vk3:VH5 VH3-13L11S FW1	15aa gly4ser	SSC-P	43	44
019037	Vk3(cambios CDR-L1):VH5	15aa gly4ser	SSC-P	45	46
019041	019006-CDR-H3 JH4	15aa gly4ser	SSC-P	47	48
019043	019006-CDR-H3 JH6	15aa gly4ser	SSC-P	49	50
019044	019006-CDR-H3 JH5a	15aa gly4ser	SSC-P	51	52
019045	019006-CDR-H3 JH5b	15aa gly4ser	SSC-P	53	54
019046	019006-CDR-H3 JH1	15aa gly4ser	SSC-P	55	56
019047	019006-CDR-H3 JH3a	15aa gly4ser	SSC-P	57	58
019048	019006 - CDR-H3 JH3b	15aa gly4ser	SSC-P	59	60
019049	019006 - CDR-H3 JH2	15aa gly4ser	SSC-P	79	80
019050	019006 - CDR-H2 cambios	15aa gly4ser	SSC-P	81	82

Construcción N°	Descripción	Ligando	Bisagra	SEQ ID NO de ADN	SEQ ID NO de AA
019051	019044	20aa gly4ser	CPPCP	83	84
019008				85	86
019009				87	88

La secuencia de aminoácidos de consenso de la construcción de TRU-016 humanizada n° 019001 (SEQ ID NO: 6; H016-019001) y de TRU-016 no humanizado (SEQ ID NO: 2; 016-G28-1) se muestra con numeración de Kabat en la Figura 30A. La Figura 30 B muestra los alineamientos de secuencia de aminoácidos de las construcciones de TRU-016 humanizadas n° 019001 (SEQ ID NO: 6), 019008 (SEQ ID NO: 86) y 019009 (SEQ ID NO: 88).

En la Figura 31 se muestran los alineamientos de secuencia de ADN y de aminoácidos de tres construcciones humanizadas de TRU-016 (019001, 019041 y 019044), que demuestran una elevada unión específica de CD37 a células B Ramos.

En la Figura 32 se muestran los alineamientos de ADN formateado FASTA y de secuencia de aminoácidos de las mismas tres construcciones humanizadas del TRU-016 (019001, 019041 y 019044).

A continuación se proporcionan regiones de bisagra adicionales (Tabla 6) y regiones estructurales adicionales (Tabla 7) que pueden usarse en las moléculas de TRU-016 humanizadas de la invención.

TABLA 6. Regiones de bisagra de SMIPs de TRU-016 humanizados

Descripción de bisagra	Secuencia de ADN o de aminoácidos	SEQ ID NO:
ccc(p)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgtccaccgtgccca	89
ccc(p)-hlgG1 (AA)	EPKSCDKTHTCPPCP	90
scc(p)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgtccaccgtgccca	91
scc(p)-hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTCPPCP	92
scc(s)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgtccaccgtgctca	93
scc(s)-hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTCPPCS	94
scs(s)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgtccaccgagctc a	95
scs(s)-hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTCPPSS	96
sss(p)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatctccaccgagccc a	97
sss(p)-hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTSPPSP	98
sss(s)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatctccaccgagctca	99
sss(s)-hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTSPPSS	100
csc(p)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatctccaccgtgccca	101
csc(p)-hlgG1 (AA)	EPKSCDKTHTSPPCP	102
csc(s)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatctccaccgtgctca	103
csc(s)-hlgG1 (AA)	EPKSCDKTHTSPPCS	104
ssc(p)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatctccaccgtgccca	105
ssc(p)-hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTSPPCP	106
scs(s)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatctccaccgtgctca	107
scs(s)-hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTSPPCS	108
css(p)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatctccaccgagccc a	109
css(p)-hlgG1 (AA)	EPKSCDKTHTSPPSP	110
css(s)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatctccaccgagctca	111
css(s)-hlgG1 (AA)	EPKSCDKTHTSPPSS	112

Descripción de bisagra	Secuencia de ADN o de aminoácidos	SEQ ID NO:
scs(s)-hlgG1	gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgtccaccgagctc a	113
(ADN)		
scs(s)-hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTCPPSS	114
hlgA1	VPSTPPTPSPSTPPTSPSPS	115
hlgA2	VPPPPP	116
hlgG3 (ADN)	gagctcaaaactcctctcggggatacgaccatacgtgtccccgc tgtcctgaaccgaagtcctgcgatacgctcgcgcatgtccacggt gcccagagcccaaatcatgcgatacgccccaccgtgtccccgc tgtcctgaaccgaagtcgatacgccccaccaccatgtccaaga tgccca	117
hlgG3 (AA)	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	118
IgG315hsc (ADN)	gagcccaaatctgtgacacacctccccatgccacggtgcccc	119
IgG315hsc (AA)	EPKSSDTPPPCPRCP	120
IgG315hcss (ADN)	gagcccaaatctgtgacacacctccccatccccacggtgcccc	121
IgG315hcss (AA)	EPKSCDTPPPSPRSP	122
IgG315hsss (ADN)	gagcccaaatctgtgacacacctccccatccccacggtgcccc	123
IgG315hsss (AA)	EPKSSDTPPPSPRSP	124
IgG3h15csc (ADN)	gagcccaaatctgtgacacacctccccatccccacggtgcccc	125
IgG3h15csc (AA)	EPKSCDTPPPSPRCP	126
hlgD	ESPKAQASSVPTAQPPQAEGSLAKATTAPATTR NTGRGGEEKKKKEKEKEEQEERETKTP	127

TABLA 7. Regiones estructurales de SMIPs de TRU-016 humanizados

Región V	Regiones estructurales VH humanas para humanización anti-CD37	SEQ ID NO:
	FR1	
VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	140
VH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS	141
VH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS	142
VH1	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT	143
VH5	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	144
VH5	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFT	145
VH7	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT	146
	FR2	
VH1	WVRQAPGQGLEWMG	147
VH1	WVRQAPGQGLEWMG	148
VH1	WVRQAPGQGLEWMG	149
VH1	WVQQAPGKGLEWMG	150
VH5	WVRQMPGKGLEWMG	151
VH5	WVRQMPGKGLEWMG	152
VH7	WVRQAPGQGLEWMG	153
	FR3	
VH1	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	154
VH1	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYYCAR	155
VH1	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDATVYYCAR	156

VH1	RVTITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCAT	157
VH5	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	158
VH5	HVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	159
VH7	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR	160
	FR4	
	WGQGT LVT VSS	161
	WGRGT LVT VSS	162
	WGQGT MVT VSS	163
	WGQGT MVT VSS	164
	WGQGT LVT VSS	165
	WGQGT LVT VSS	166
	WGQGT LVT VSS	167
	WGQGT T VTVSS	168
	WGKGTT VTVSS	169
	Regiones estructurales VK humanas para humanización anti-CD37	
	FR1	
VK3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	170
VK3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	171
VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	172
VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	173
VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	174
VK1	NIQMTQSPSAMSASVGDRVITC	175
VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	176
VK1	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITC	177
VK1	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC	178
VK1	AIRMTQSPFSLSASVGDRVITC	179
VK1	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	180
VK1	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITC	181
	FR2	
VK3	WYQQKPGQAPRLIY	182
VK3	WYQQKPGQAPRLIY	183
VK1	WYQQKPGKAPKLLIY	184
VK1	WYQQKPGKVPKLLIY	185
VK1	WYQQKPGKAPKRLIY	186
VK1	WFQQKPGKVPKHLIY	187
VK1	WFQQKPGKAPKSLIY	188
VK1	WYQQKPGKAPKLLIY	189
VK1	WYQQKPGKAPKLLIY	190
VK1	WYQQKPAKAPKLFYIY	191
VK1	WYQQKPGKAPKLLIY	192
VK1	WYQQKPGKAPKLLIY	193
	FR3	
VK3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	194
VK3	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLPEPDAVYYC	195
VK1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	196

VK1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	197
VK1	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	198
VK1	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	199
VK1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	200
VK1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	201
VK1	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	202
VK1	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC	203
VK1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	204
VK1	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	205
	FR4	
	FGQGTKVEIK	206
	FGQGTKLEIK	207
	FGPGTKVDIK	208
	FGGGTKVEIK	209
	FGQGTRLEIK	210

Es de esperar que a los especialistas en la técnica se les ocurran numerosas modificaciones y variaciones de la invención tal cual se ha establecido en los ejemplos ilustrativos anteriores. Por consiguiente, solo deberían aplicarse a la invención las limitaciones que aparecen como tales en las reivindicaciones anexas.

Secuencias de ADN y de aminoácidos correspondientes a las SEQ ID NOS: 79-88

Construcción nº	SEQ ID NO:	Secuencia de ADN o de aminoácidos
019049	79	aagcttgccgcatggaagccccagcgcagcttcttctcctgctactctggctcccag ataccaccggagaaattgtgttgacacagctctccagccaccctgtcttgtctccaggcga aagagccaccctctcctgccgagcaagtgaatgtttacagctacttagcctgttacca acagaaacctggccaggctcctaggtctcctcatctatttgcaaaaaccttagcagaagg aattccagccagggtcagtggcagtggaatccgggacagacttcactctcaccatcagca gcctagagcctgaagatttgcagttattactgtcaacatcattccgataatccgtggacat tcggccaagggaccaagggtggaatcaaagggtggcgggtggctcgggagggtggat ctggaggagggtggaccgggtgaggtgcagctgggtcagctcggagcagaggtgaaaa agcccgagagctctgaagatttctgtgaagggatccgggtactcattcactggctacaa tatgaactgggtgcgcagatgccgggaaaggcctcgagtggtggcaatattgatc cttattaggtgtactacctacaaccggaagtcaagggccaggtcactatctccgccga caagtccatcagcaccgcctacctgcaatggagcagcctgaaggcctcggacaccgc catgtattactgtgcacgctcagtcggcccttgcacctcggggcagaggcaccctggtc actgtctcctctgatcaggagcccaaatctctgacaaaactcacacatctccaccgtgcc cagcacctgaactcctgggtggaccgtcagctctcctctccccccaaaaacccaaggac accctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacga agaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgaggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggcagcgtcctcacc gtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaa gccctcccagccccatcgagaaaacatctccaagccaaagggcagccccgaga accacaggtgtacaccctgcccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcag cctgacctgcctggtaaaggcttctatccaagcgacatcgccgtggagtgaggagagca atgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggct ccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgt cttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctc cctgtctccgggtaaatgatctaga
019049	80	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASENVYSYLAWYQQKPGQAPRLIYFAKTLAEGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSDNPWTFGQGKVEIKGGG GSGGGGSGGGGTGEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTGYNMNWVRQMPGKLEWMGNIDPYYGGTTYNRKFKGQ VTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCARSVGPFDLWGRGT LVTVSSDQEPKSSDKTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Construcción nº	SEQ ID NO:	Secuencia de ADN o de aminoácidos
019050	81	aagcttgccgcatggaagccccagctcagcttctctcctcctgctactctggctccag ataccaccggagaaattgtgtgacacagctccagccaccctgtcttgtctccaggcga aagagccaccctctcctgccgagcaagtgaatgtttacagctacttagcctggtagca acagaaacctggccaggctcctaggctcctcatctattttgcaaaaaccttagcagaagg aattccagccagggtcagtgagtgatccgggacagactcactctcaccatcagca gcctagagcctgaagatttgcagtttactgtcaacatcattccgataatccgtggacat tcggccaagggaccaaggtggaatcaaggtggcgggtgctcgggagggtggat ctggaggaggtgggctagcaggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaa agccccgagagctctgaagatttctgtaagggtaccgggtactcattcactagctaca tatgaactgggtgcgccagatgcccgggaaaggcctggagtggatgggcaatattgat ccttattaggtgtactaactacgcccagaagttccaggggccagggtcactatctccgccc acaagtcacagcaccgcctacgtcaatggagcagcctgaaggcctcggacaccg ccatgtattactgtcacgctcagtcggccctatggactactggggccgcccaccctgg tactgtctcctctgatcaggagcccaatctctgacaaaactcacacatctccaccgtg cccagcacctgaactcctgggtgacgtcagctctcctctcccccaaaaaccaagg acacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtagctgagccac gaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgcca agacaaagccgcccggagagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctc accgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaac aaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaagccaaggggcagccccg agaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggt cagcctgacctgcctgtcaaaggcttctatccaagcagatcgcctggagtgggaga gcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgac ggctccttctcctacagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctcctgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaatga
019050	82	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASENVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYFAKTLAEGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSDNPWTFGQGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGASEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTSYNMNWVRQMPGKGLEWMGNIDPYYGGTNYAQKFQGG VTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCARSVGPMDYWGRG TLVTVSSDQEPKSSDKTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Construcción nº	SEQ ID NO:	Secuencia de ADN o de aminoácidos
019051	83	aagcttgccgcatggaagcccagcgcagcttctctcctctgctactctggctcccag ataccaccggagaaaattgtgtgacacagctccagccaccctgtcttctccaggcga aagagccaccctctcctgccgagcaagtgagaatgtttacagctacttagcctggtagca acagaaacctggccaggctcctaggctcctcatctatttgcataaaccttagcagaagg gattccagccagattcagtggtgaggttccgggacagacttcactctcaccatcagcag cctagagcctgaagatttgcagtttattactgtcaacatcattccgataatccgtggacatt cggccaagggaccaagggtgaaatcaaagggtggcgtggcgtggcgtgggtggat ctggaggaggtgggagcggaggaggagctagcaggtgcagctgggtcagctgga gcagaggtgaaaaagccgggagagctctgaagatttctgtaaggatccggttactc attcactggctacaatatgaactgggtgcccagatgccgggaaaggcctcgaatgg atgggaatattgatcttattatgggtgtactacctacaaccggaagltcaaggccagg tcactatctccgccaagtcacagcaccgctacgtcaaggagcagcctgaag gcctcggacaccgcatgtattactgtcacgctcagtcggcccttcgactcctggggcc agggcaccctggctactgtctgagttgtccaccgtgccagcacctgaactcctgggtg gaccgtcagctctcctctcccccataacccaaggacaccctcatgatctccggacc ctgaggtcacatgctgggtgggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagltcaa ctggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccggggaggagc agtacaacagcacgtaccgtgtgtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg aatggcaaggagtacaagtgaaggtcctcaacaagccctccagccccatcgag aaaaccatctcaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc cccatccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctggtcaaagg ctctatccaagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagagaaca ctacaagaccacgcctccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctc accgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcctgatgatg aggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatgactc taga
019051	84	MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASENVVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYFAKTLAEGIPARFSGSGS GTDFTLTISSEPEDFAVYYCQHSDNPWTFGGGTKVEIKGGG SGSGGGSGGGSGGGASEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTGYNMNWVRQMPGKGLEWMGNIDPYYGGTTYNRKF KGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSVGPFD SW GQGTLVTVSSCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Construcción nº	SEQ ID NO:	Secuencia de ADN o de aminoácidos
019008	85	aagcttgccgcatggaagcccagctcagctctcttctctctgctactctggctcccag ataccaccggagaaattggttgacacagctccagccaccctgtcttgtctccaggcga aagagccaccctctctgccaacaagtgaaaatgttacagctacttagcctggtacca acagaaacctggccaggctcctaggctcctcatctatttgcacaaaccttagcagaagg aattccagccagggtcagtggtgagtgatccgggacagacttactctcaccatcagca gcctagagcctgaagatttgcagtttattactgtcaacatcattccgataatccgtggacat tcggccaagggaccaaggtggaatcaaaggtggcggtggtcggcggtggtggtggt ctggaggaggtgggaccgtgaggtgcagctggtgcagctggtgagcagagggtgaaa agccccggagagctctgaagatttctgtaagggtacgggtactcattcactggctaca tatgaactgggtgcgccaagatgcccggaaggcctggagtgatgggcaatattgat ccttattatggtgtactacctacaaccggaagttcaagggccagggtcactatctccgccg acaagtccatcagcaccgcctacctgcaatggagcagcctgaaggcctcggacaccg ccatgtattactgtgcacgctcagtcggccctatggactactggggccgcccaccctgg tactgtctcctctgatcaggagcccaaatctctgacaaaactcacacatctccaccgtg cccagcacctgaactcctgggtggaccgtcagcttctcttcccccaaaaccaagg acaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtgacgtgagccac gaagaccctgagggtcaagtcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatcca agacaaagccgaggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtcctcaac aaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg agaaccacagggtgtacaccctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggt cagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatccaagcgacatgccgtggagtgaggaga gcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccggtcgtggactccgac ggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaatga
019008	86	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR TSENVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYFAKTLAEGIPARFSGSGS GTDFTLTISSEPEDFAVYYCQHSDNPWTFGQGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGASEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTGYNMNWVRQMPGKLEWMGNIDPYYGGTTYNRKFKGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARSVGPM DYWGRGT LVTVSSDQEPKSSDKTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Construcción nº	SEQ ID NO:	Secuencia de ADN o de aminoácidos
019009	87	aagcttgccgccatggaagcccgagctcagcttctctcctcctgctactctggctcccag ataccaccggtgaattgtgtgacacagctctccagccaccctgtctttgtctccaggcga aagagccaccctctcctgccgaacaagtgaatgtttacagctacttagcctgggtacca acagaaacctggccaggctcctaggtcctcatctatttgcaaaaaccttagcagaagg aattccagccagggtcagtggtgagtgatccgggacagactcactctcaccatcagca gcctagagcctgaagatttgcagtttattactgtcaacatcattccgataatccgtggacat tcggccaagggaccaaggtggaaatcaaggtggcgggtggcggcggtgggtggat ctggaggagggtgggctagcaggtgcagctgggtcagctggagcagaggtgaaaa agcccgagagctctgaggatttctgtaagggtaccggttactcattcactggctacaa tatgaaactgggtgcgcccagatgccgggaaaggcctggagtggaatgggcaatattgat ccttattatgggtactactacaaccggaagtcaagggccaggtcactatctccgccg acaagtcacagcaccgctacctgcaatggagcagcctgaaggcctcggacaccg cctgtattactgtgcagctcagtcggccctatggactactggggccgcgccacctgg tcactgtctcctgatcaggagcccaatcttgacaaaactcacatctccaccgtg cccagcacctgaactcctgggtggaccgtcagcttctcttcccccaaaaaccaagg acacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtgggtgacgtgagccac gaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc agacaaagccgcccggaggagcagtagaacagcagcgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagaagtgaagggtctcaac aaagccctcccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccg agaaccacagggttacacctgccccatcccggtgagctgaccaagaaccagggt cagcctgacctgctggtcaaaggctctatccaagcgacatcgccgtggagtgaggaga gcaatgggcagccggagagaacaactacaagaccacgcctccgtgctggactccgac ggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaatga
019009	88	MEAPAQLFLLLLWLPTDTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR TSENVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYFAKTLAEGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSDNPWTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGASEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYS FTGYNMNWVRQMPGKGLEWMGNIDPYYGGTTYNRKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSVGPMDYWGRGT LVTVSSDQEPKSSDKTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Grosmaire et al.

5 <120> Reducción de células B usando moléculas de unión específica a CD37 y de unión específica a CD20

<130> 30906/41324PCT

<150> US 60/702.499

10 <151> 25-07-2005

<150> US 60/800.595

<151> 16-05-2006

15 <160> 78

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 1510

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polinucleótido TRU-016

<400> 1

```

aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tctgctaata cagtgcctca      60
gtcataattg ccagaggagt cgacatccag atgactcagt ctccagcctc cctatctgca      120
tctgtgggag agactgtcac catcacatgt cgaacaagtg aaaatgttta cagttatttg      180
gcttggtatc agcagaaaaca gggaaaatct cctcagctcc tggctctctt tgcaaaaacc      240
ttagcagaag gtgtgccatc aagggttcagt ggcagtggtt caggcacaca gttttctctg      300
aagatcagca gcctgcagcc tgaagattct ggaagttatt tctgtcaaca tcattccgat      360
aatccgtgga cgttcggtgg aggcaccgaa ctggagatca aagggtggcg tggctcgggc      420
ggtggtgggt cgggtggcgg cggatcgtca gcggtccagc tgcagcagtc tggacctgag      480
tcggaaaagc ctggcgcttc agtgaagatt tctgcaagg cttctggtta ctattcact      540
ggctacaata tgaactgggt gaagcagaat aatggaaaga gccttgagtg gattggaaat      600
attgatcctt attatgggtg tactacctac aaccggaagt tcaagggcaa ggccacattg      660
actgtagaca aatcctccag cacagcctac atgcagctca agagtctgac atctgaggac      720
tctgcagtct attactgtgc aagatcggtc ggccctatgg actactgggg tcaaggaacc      780
tcagtcaccg tctcttcaga tctggagccc aaatcttctg acaaaaactca cacatctcca      840
ccgtgccccag cacctgaact cttgggtgga ccgtcagctc tctcttccc cccaaaaacc      900
aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc      960
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc      1020
aagaçaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc      1080

```

30

ES 2 460 517 T3

```

gccccgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc 1260
ctggtcaaag gcttctatcc aagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcaaccg 1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1500
tgagtctaga                                     1510

```

<210> 2

<211> 496

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido TRU-016

10

<400> 2

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1           5           10           15

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

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

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

Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly
65           70           75           80

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu
85           90           95

Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln
100          105          110

His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu
115          120          125

Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130          135          140

```

ES 2 460 517 T3

Ser Ser Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu Lys Pro
145 (150 155 160

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
165 170 175

Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu
180 185 190

Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg
195 200 205

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
210 215 220

Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
260 265 270

His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
385 390 395 400

ES 2 460 517 T3

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 435 440 445
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 450 455 460
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490 495

<210>

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido TRU-015

10

<400> 3

aagcttgccg	ecatggattt	tcaagtgcag	attttcagct	tcttgcta	aat	cagtgttca	60
gtcataatgt	ccagaggaca	aattgttctc	tcccagcttc	cagcaatcct	gtctgcatct		120
ccaggggaga	aggtcacaat	gacttgcagg	gccagctcaa	gtgtaagtta	catgcactgg		180
taccagcaga	agccaggatc	ctccccaaa	ccctggattt	atgccccatc	caacctggct		240
tctggagtcc	ctgctcgctt	cagtggcagt	gggtctggga	cctcttactc	tctcacaatc		300
agcagagtgg	aggctgaaga	tgctgccact	tattactgcc	agcagtggag	ttttaacca		360
cccacgttcg	gtgctgggac	caagctggag	ctgaaagatg	gcggtggctc	gggcggtggt		420
ggatctggag	gaggtgggag	ctctcaggct	tatctacagc	agtctggggc	tgagtcggtg		480
aggcctgggg	cctcagtga	gatgtcctgc	aaggcttctg	gctacacatt	taccagttac		540
aatatgcact	gggtaaagca	gacacctaga	cagggcctgg	aatggattgg	agctatttat		600
ccaggaaatg	gtgatacttc	ctacaatcag	aagttcaagg	gcaaggccac	actgactgta		660
gacaaatcct	ccagcacagc	ctacatgcag	ctcagcagcc	tgacatctga	agactctgcg		720
gtctatttct	gtgcaagagt	ggtgtactat	agtaactctt	actggtactt	cgatgtctgg		780
ggcacaggga	ccacgggtcac	cgtctctgat	caggagccca	aatcttgtga	caaaactcac		840
acatctccac	cgtgctcagc	acctgaactc	ctgggtggac	cgtcagtctt	cctcttcccc		900

```

ccaaaaccca aggcacaccc catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggagggtg 960
gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 1020
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc 1080
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caagggtctcc 1140
aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
gaaccacagg tgtacacccg gcccocatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatcca agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
ccgggtaaatt gatctaga 1518

```

<210> 4

<211> 499

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido TRU-015

<400> 4

```

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

```

ES 2 460 517 T3

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 130 135 140
 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
 145 150 155 160
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 165 170 175
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 180 185 190
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 195 200 205
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 225 230 235 240
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255
 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Cys
 260 265 270
 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 275 280 285
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 305 310 315 320
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380

ES 2 460 517 T3

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys

<210> 5

<211> 1482

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 5

atggaagccc cagctcagct tctcttcttc ctgtactctt ggctcccaga taccaccgga	60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ctaggctcct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc	240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa	360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt	420
gggaccggtg aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagtct	480
ctgaagattt cctgtaaggg atccgggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg	540
cgccagatgc cggggaaagg cctcgagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatgggtgt	600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtactatctt ccgccgacaa gtccatcagc	660

```

accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcggcacc tggtcactgt ctccctctgat 780
caggagccca aatcttctga caaaactcac acatctccac cgtgcccagc acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 900
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 960
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag 1020
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg 1080
aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1200
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatcca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat ggcagcccg agaacaacta caagaccacg 1320
cctcccgtgc tggaactcca cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1440
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1482

```

<210> 6

<211> 493

5 <212> P12T

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 6

```

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 Thr Ser Glu Asn
          35          40          45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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

```

ES 2 460 517 T3

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

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160

Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175

Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205

Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220

Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240

Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255

Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350

ES 2 460 517 T3

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
450 455 460

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 7

<211> 1482

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 7

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga	60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc	240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa	360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt	420
gggagctctg aggtgcagct ggtgcagctt ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagtct	480
ctgaagattt cctgtaaggg atccggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg	540

ES 2 460 517 T3

```
cgccagatgc cgggaaagg cctcgagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatgggtggt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcggcaccc tggtcactgt ctctctgat 780
caggagccca aatcttctga caaaactcac acatctccac cgtgccagc acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 900
cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 960
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgccà agacaaagcc gcgggaggag 1020
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1080
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1200
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatcca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1320
cctcccgtagc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1440
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1482
```

<210> 8

<211> 493

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 8

```
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 Thr Ser Glu Asn
      35      40      45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335

ES 2 460 517 T3

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 9

<211> 1482

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 9

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccacccga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc 120
 ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240
 aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcgcccaa 360
 gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt 420

ES 2 460 517 T3

```

gggaccggtg aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagt cgaaaaagcc cggagagtct 480
ctgaagattt cctgtaaggg atccgggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg 540
cgccagatgc ccgggaaagg cctcgagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatgggtgg 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtog gccctatgga ctactggggc cgcggcaccc tggtcactgt ctcctctgat 780
caggagccca aatcttctga caaaactcac acatctccac cgtgcccagc acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 900
cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 960
ttcaactggg acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 1020
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1080
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1200
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatcca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1320
cctcccgtgc tggactccga cggtccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcagggtgg agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac 1440
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1482

```

<210> 10

<211> 493

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 10

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 Thr Ser Glu Asn
35 40 45

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

ES 2 460 517 T3

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Ser Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320

ES 2 460 517 T3

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 11

<211> 1482

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 11

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccacogga	60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
ctctcctgcc gaacaagtca aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ctaggctcct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc	240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	300

gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
 gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
 gggaccgggt aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagtct 480
 ctgaagattt cctgtaaggg atccgggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg 540
 cgccagatgc ccgggaaagg cctcgagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatgggtgt 600
 actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
 accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
 cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgccggcacc tggtcactgt ctctctgat 780
 caggagccca aatcttctga caaaactcac acatctccac cgtgcccagc acctgaactc 840
 ctgggtggac cgtcagttct cctcttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc 900
 cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgagggtcaag 960
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 1020
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg 1080
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1140
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc 1200
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatcca 1260
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1320
 cctcccgtagc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctcgtga tgcattgagg tctgcacaac 1440
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1482

<210> 12

<211> 493

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 12

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe 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 Thr Ser Gln Asn
 35 40 45

ES 2 460 517 T3

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300

ES 2 460 517 T3

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 13
 <211> 1482
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TRU-016 humanizado

<400> 13

atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc 120
 ctctcctgcc gaacaagtga aagtgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 180

```

ggccaggctc ctaggctcct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
gggaccggtg aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagtct 480
ctgaagattt cctgtaaggg atccggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg 540
cgccagatgc cgggaaagg cctcgagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatggtggt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cggcgacccc tggtcactgt ctctctgat 780
caggagccca aatcttctga caaaactcac acatctccac cgtgcccagc acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagtcct cctcttcccc caaaaccca aggacaccct catgatctcc 900
cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 960
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag 1020
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggtg 1080
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1200
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatcca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1320
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcagaggc tctgcacaac 1440
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaata ga 1482

```

<210> 14

<211> 493

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 14

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe 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

```

ES 2 460 517 T3

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Ser
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285

ES 2 460 517 T3

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
290 295 300

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
420 425 430

Pro/Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
450 455 460

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 15

<211> 1482

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 15

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

ES 2 460 517 T3

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc 120
ctctcctgcc gagcaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ctaggctcct catctatfff gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggctcgggcg gtgggtggatc tggaggaggt 420
gggaccgggt aggtgcagct ggtgcagctt ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagtct 480
ctgaagattt cctgtaaggg atccggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg 540
cgccagatgc ccgggaaagg cctcgagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatgggtgt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcggcaccc tggtcactgt ctctctgat 780
caggagccca aatcttctga caaaactcac acatctccac cgtgcccagc acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagctct cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 900
cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 960
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgaggagg 1020
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1080
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1200
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatcca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1320
cctcccgtag tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1440
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaag ga 1482

```

<210> 16

<211> 493

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 16

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1

5

10

15

ES 2 460 517 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 Glu Asn
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270

ES 2 460 517 T3

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 17

<211> 1479

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 17

ES 2 460 517 T3

```

atggaagcac cagcgagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt      60
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga gactgtcacc      120
atcacatgtc gaacaagtga aaatgtttac agttatttgg cttggtatca gcagaaacag      180
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctctttt gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca      240
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga agatcagcag cctgcagcct      300
gaagattctg gaagttattt ctgtcaacat cattccgata atccgtggac gttcggtgga      360
ggcaccgaac tggagatcaa aggtggcggt ggctcgggcg gtggtgggtc ggggtggcggc      420
ggagctagcg aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagtct      480
ctgaggattt cctgtaaggg atccgggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg      540
cgccagatgc ccgggaaagg cctggagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatggtggt      600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc      660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca      720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcgccaccc tggtcactgt ctctcagagc      780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gcccagcacc tgaactcctg      840
ggtggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg      900
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc      960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag     1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctacccgtcc tgcaccagga ctggctgaat     1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc     1140
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg     1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc     1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct     1320
cccggtgctg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcacctg ggacaagagc     1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac     1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctcog ggtaaatga                          1479

```

<210> 18

<211> 492

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 18

Met. Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

ES 2 460 517 T3

1	5	10	15
Asp Thr Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser	20	25	30
Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn	35	40	45
Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro	50	55	60
Gln Leu Leu Val Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser	65	70	75
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser	85	90	95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser	100	105	110
Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Gly	115	120	125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Glu	130	135	140
Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser	145	150	155
Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn	165	170	175
Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly	180	185	190
Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys	195	200	205
Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu	210	215	220
Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala	225	230	235
Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr	245	250	255

ES 2 460 517 T3

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

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 19

<211> 1479

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 19

```

atggaagcac cagcgagct tctcttctc ctgtactct ggctcccaga taccaccggt    60
gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc    120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct    180
ggccaggetc ctaggetcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc    240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcaacttca ccatcagcag cctagagcct    300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa    360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtagtggatc tggaggaggt    420
ggagctagcg cgggccagct gcagcagctt ggacctgagt cggaaaagcc tggcgcttca    480
gtgaagatth cctgcaaggc ttctgggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg    540
aagcagaata atggaagag ccttgagtgg attggaaata ttgatcetta ttatgggtgt    600
actacctaca accggaagtt caagggcaag gccacattga ctgtagacaa atcctccagc    660
acagcctaca tgcagctcaa gagtctgaca tctgaggact ctgcagtcta ttactgtgca    720
agatcggtcg gccctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcgagc    780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gcccagcacc tgaactcctg    840
ggtggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg    900
accctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc    960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag   1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggtgaat   1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc   1140
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg   1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc   1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct   1320
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc   1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac   1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga                               1479

```

<210> 20

<211> 492

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 20

ES 2 460 517 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 Thr Ser Glu Asn
35 40 45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
100 105 110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ala
130 135 140

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu Lys Pro Gly Ala Ser
145 150 155 160

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
165 170 175

Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
180 185 190

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
195 200 205

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
210 215 220

Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
225 230 235 240

ES 2 460 517 T3

Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 21

<211> 1479

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 21

ES 2 460 517 T3

```

atggaagcac cagcgcagct tctcttctc ctgtactctt ggtcccaga taccaccggt 60
gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc 120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ctaggctcct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240
aggttcagtg gcagtggtgc cgggacagac ttactcttca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
ggagctagcc aggtgcagct ggtggagtct ggtggaggcg tggccagcc tgggaggtcc 480
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagt gctacaatat gaactgggtc 540
cgccagatgc ccgggaaagg cctggagtgg atgggcaata ttgaccta ttatggtggt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgaca gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcggcaccc tggtcactgt ctctcagc 780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gccagcacc tgaactcctg 840
ggtggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccg 900
acctctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg 1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc 1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
cccgctgctg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1479

```

<210> 22

5 <211> 492

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> TRU-016 humanizado

<400> 22

ES 2 460 517 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 Thr Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gln
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220

Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240

Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255

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

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

- 5 <210> 23
 <211> 1503
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 23

5

```

atggaagcac cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt      60
gcggtccagc tgcagcagtc tggacctgag tcggaaaagc ctggcgcttc agtgaagatt      120
tcctgcaagg cttctgggta ctcattcact ggctacaata tgaactgggt gaagcagaat      180
aatggaaaag gccttgagtg gattggaaat attgatcctt attatgggtg tactacctac      240
aaccggaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac      300
atgcagctca agagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatcggtc      360
ggccctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcttctgg tggcggtggc      420
tcgggcggtg gtgggtcggg tggcgcgga tcaggaggag gcgggagtg tagcgaaatt      480
gtgttgacac agtctccagc caccctgtct ttgtctccag gcgaaagagc caccctctcc      540
tgccgaacaa gtgaaaatgt ttacagctac ttagcctggt accaacagaa acctggccag      600
gctcctaggc tcctcatcta ttttgcaaaa accttagcag aaggaattcc agccagggtc      660
agtggcagtg gatccgggac agacttcact ctcaccatca gcagcctaga gcctgaagat      720
tttgagttt attactgtca acatcattcc gataatccgt ggacattcgg ccaagggacc      780
aaggtggaag tcaaaggctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatctcca      840
ccgtgccagc cacctgaact cctgggtgga ccgtcagctt tcctcttccc cccaaaaccc      900
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc      960
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc     1020
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc     1080
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc     1140
ctcccagccc ccacgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag     1200
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc     1260
ctggtcaaag gcttctatcc aagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg     1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt cttcctctac     1380
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg     1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa     1500
tga                                                                 1503

```

10

<210> 24

<211> 500

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 24

20

ES 2 460 517 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 Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu
 20 25 30
 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 35 40 45
 Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser
 50 55 60
 Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Ile
 145 150 155 160
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
 165 170 175
 Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala
 180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Phe
 195 200 205

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

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp
 225 230 235 240

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr Phe
 245 250 255

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Ser Glu Pro Lys Ser
 260 265 270

Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495

Ser Pro Gly Lys
 500

<211> 1488
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> TRU-016 humanizado

<400> 25

```

atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataattgcc      60
agaggagtcg aaattgtgtt gacacagtct ccagccaccc tgtctttgtc tccaggcgaa      120
agagccaccc tctcctgccg aacaagtga aatgtttaca gctacttagc ctggtaccaaa      180
cagaaacctg gccaggctcc taggctcctc atctattttg caaaaacctt agcagaagga      240
attccagcca ggttcagtggt cagtggatcc gggacagact tcactctcac catcagcagc      300
ctagagcctg aagattttgc agtttattac tgtcaacatc attccgataa tccgtggaca      360
ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa ggtggcgggt gctcggggcg tgggtgatct      420
ggaggaggtg gagctagcgc ggtccagctg cagcagctct gacctgagtc ggaaaagcct      480
ggcgcttcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggttact cattcactgg ctacaatatg      540
aactgggtga agcagaataa tggaaagagc cttgagtggg ttggaaatat tgatccttat      600
tatgggtgta ctacctacaa ccggaagttc aagggcaagg ccacattgac tgtagacaaa      660
tcctccagca cagcctacat gcagtcgaag agtctgacat ctgaggactc tgcagtctat      720
tactgtgcaa gatcggtcgg ccctatggac tactggggtc aaggaaacct agtcaccgtc      780
tcctcgagcg agcccaaato ttctgacaaa actcacacat ctccaccgtg cccagcacct      840
gaactcctgg gtggaccgtc agtcttcctc tccccccaa aacccaagga caccctcatg      900
atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtgggtggac tgagccacga agaccctgag      960
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg      1020
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac      1080
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc      1140
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc      1200
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggettc      1260
tatccaagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag      1320
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tcttcttccc tctacagcaa gctcaccgtg      1380
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg      1440
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga      1488

```

15 <210> 26
<211> 495
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> TRU-016 humanizado

<400> 26

ES 2 460 517 T3

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	1	5	10	15
Val	Ile	Ile	Ala	Arg	Gly	Val	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	20	25	30	
Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Thr	35	40	45	
Ser	Glu	Asn	Val	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	50	55	60	
Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	65	70	75	
Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	85	90	95	
Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	100	105	110	
His	His	Ser	Asp	Asn	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	115	120	125	
Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	130	135	140	
Ala	Ser	Ala	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Ser	Glu	Lys	Pro	145	150	155	
Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	165	170	175	

ES 2 460 517 T3

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

ES 2 460 517 T3

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 450 455 460

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490 495

<210> 27
 <211> 1503
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TRU-016 humanizado

<400> 27

atggaagcac cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60
 gcggtccagc tgcagcagtc tggacctgag tcggaaaagc ctggcgcttc agtgaagatt 120
 tcttgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctacaata tgaactgggt gaagcagaat 180
 aatggaaaga gccttgagtg gattggaaat attgatcctt attatggtgg tactacctac 240
 aaccggaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 300
 atgcagctca agagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatcggtc 360
 ggccctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcttctgg tggcggtggc 420
 tcgggcggtg gtgggtcggg tggcgcgga tcaggaggag gcgggagtg tagcgaatt 480
 gtgttgacac agtctccagc caccctgtct ttgtctccag gcgaaagagc caccctctcc 540
 tgccgaacaa gtgaaaatgt ttacagctac ttagcctggt accaacagaa acctggccag 600
 gctcctaggc tcctcatcta ttttgcaaaa accttagcag aaggaattcc agccagggtc 660
 agtggcagtg gatccgggac agacttcaact ctcaccatca gcagcctaga gcctgaagat 720
 tttgcagttt attactgtca acatcattcc gataatccgt ggacattcgg ccaagggacc 780
 aagggtgaaa tcaaaggctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatgccca 840
 ccgtgccag cacctgaact cctgggtgga ccgtcagttc tctcttccc cccaaaacc 900
 aaggacacc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 960
 cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc 1020
 aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080
 gtctgcacc aggaactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140

ES 2 460 517 T3

```
ctcccagccc ccacgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag 1200
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc 1260
ctggtcaaag gcttctatcc aagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380
agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1500
tga 1503
```

<210> 28

<211> 500

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 28

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

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

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
35      40      45

Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser
50      55      60

Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr
65      70      75      80

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

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
100     105     110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
115     120     125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130     135     140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Ile
145     150     155     160
```

ES 2 460 517 T3

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
485 490 495

Ser Pro Gly Lys
500

<210> 29

<211> 1479

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 29

atggaagcac cagcgagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt	60
gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
ctctctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ctaggctoct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc	240
aggttcagtg gcagtggtgc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaaat cattccgata atccgtggac attcggccaa	360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt	420
ggagctagcg cgggtccagct gcagcagctt ggacctgagt cggaaaagcc tggcgcttca	480
gtgaagattt cctgcaaggc ttctgggtac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg	540
aagcagaata atggaaagag ccttgagtgg attggaaata ttgatcctta ttatggtggt	600
actacctaca accggaagtt caagggaag gccacattga ctgtagacaa atcctccagc	660
acagcctaca tgcagctcaa gagtctgaca tctgaggact ctgcagtcta ttactgtgca	720
agatcggtcg gccctatgga ctactggggt caaggaaacct cagtcaccgt ctctcgagc	780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gcccagcacc tgaactcctg	840
ggtggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg	900

ES 2 460 517 T3

```

accctgagg tcacatgctt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactgggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc 1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
cccggtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcacctg ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1479

```

<210> 30

<211> 492

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 30

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe 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 Thr Ser Glu Asn
35          40          45

```

```

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

```

```

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
100          105          110

```

```

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115          120          125

```

ES 2 460 517 T3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ala
130 135 140

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu Lys Pro Gly Ala Ser
145 150 155 160

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
165 170 175

Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
180 185 190

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
195 200 205

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
210 215 220

Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
225 230 235 240

Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
245 250 255

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

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 31

<211> 1479

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 31

atggaagcac cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt	60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc	240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa	360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt	420
ggagctagcg cggtcagct gcagcagctt ggacctgagt cggaaaagcc tggcgcttca	480
gtgaagattt cctgcaaggc ttctgggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg	540
aagcagaata atggaagag ccttgagtgg attggaata ttgaccta ttatggtggt	600
actacctaca accggaagtt caagggcaag gccacattga ctgtagacaa atcctccagc	660
acagcctaca tgcagctcaa gactctgaca tctgaggact ctgcagtcta ttactgtgca	720
agatcggtcg gccctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcgagc	780

ES 2 460 517 T3

gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 840
 ggtggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 900
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
 atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1200
 gatgagttga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc 1260
 gacatcgccc tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1479

<210> 32

<211> 492

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 32

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 Thr Ser Glu Asn
 35 40 45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110

ES 2 460 517 T3

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Ala
 130 135 140
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu Lys Pro Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 210 215 220
 Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 33

<211> 1479

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 33

atggaagcac cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc 120

ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 180

ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240

aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300

gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360

gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt 420

ggagctagcc aggtgcagct ggtggagtct ggtggaggcg tgggccagcc tgggagggtc 480

ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc 540

cgccagatgc cgggaaagg cctggagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatggtggt 600

actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660

ES 2 460 517 T3

```

accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcggcaccc tggtcactgt ctccctcgagc 780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 840
ggtggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg 900
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccctcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccatt cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gcccgcagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg 1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc 1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaata 1479

```

<210> 34

<211> 492

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 34

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe 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 Thr Ser Glu Asn
35          40          45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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

```

ES 2 460 517 T3

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 35

<211> 1479

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 35

atggaagcac cagcgcagct tctcttctct ctgtactctt ggctcccgga taccaccggt	60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc	240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa	360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt	420
ggagctagcc aggtgcagct ggtggagtct ggtggaggcg tggtecagcc tgggaggtcc	480
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc	540

```
cgccagatgc ccgggaaagg cctggagtg atgggcaata ttgatcctta ttatggtggt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcggcaccc tggtcactgt ctctcagagc 780
gagcccaa at cttctgacaa aactcacaca tgcccacgt gccagcacc tgaactcctg 840
ggtggaccgt cagtcttct cttcccccca aaacccaagg acacctcat gatctcccg 900
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccg 1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc 1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
cccgctgtgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1479
```

<210> 36

<211> 492

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 36

```
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 Thr Ser Glu Asn
35          40          45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
65          70          75          80
```

ES 2 460 517 T3

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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335

ES 2 460 517 T3

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 37

<211> 1476

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 37

atggaagcac cagcgcagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccaccggt	60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ctaggctct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc	240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa	360
gggaccaagg tggaatcaa aggtggcggt ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt	420

```

ggggctagcg aggtgcagct ggtggagtct ggtggaggct tggccagcc tggagggtcc 480
ctgagactct cctgtgcagc ctctggatcc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc 540
cgccagatgc ccgggaaagg cctggagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatgggtgt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgccggcacc tggtcactgt ctctcagagc 780
gagcccaaat ctcttgacaa aactcacaca tctccaccgt gcccgacacc tgaactcctg 840
ggtggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg 900
accctgaggg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggagggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctccaccgtc tgcaccagga ctggctgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg 1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaaggctt ctatccaagc 1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
cccggtgctg actccgacgg ctcttctctt ctctacagca agctcacctg ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctt cctgtctccg ggtaaa 1476

```

<210> 38

<211> 492

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> TRU-016 humanizado

<400> 38

```

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 Thr Ser Glu Asn
35           40           45

```

```

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

```

ES 2 460 517 T3

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320

ES 2 460 517 T3

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 39

<211> 1476

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 39

atggaagcac cagcgagct tctcttctct ctgtactctt ggctcccaga taccaccggt	60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ctaggctcct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc	240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	300

ES 2 460 517 T3

```

gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccâagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
ggggctagcg aggtgcagct ggtggagtct ggtggaggct tggtecagcc tggagggtcc 480
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc 540
cgccagatgc cgggâaagg cctggagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatggtggt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcgccaccc tggtcactgt ctctcgagc 780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 840
ggtggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acâccctcat gatctcccgg 900
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccâaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
taâacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggtgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctcâac aaagccctcc cagcccccâ cagâââââ 1140
atctcâââ ccaâââggga gâââââââ ccacaggtgt acaccctgâ cccâââââ 1200
gatgagctga câââââââ ggtcagcctg acctgcctgg tcaâââgctt ctââââââ 1260
gaââââââ tggagtggga gagcaatggg cagccggaga aâââââââ gâââââââ 1320
cccgctgctg actccgâââ ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggââââââ 1380
aggtggcââ agggââââ cttctcâââ tccgtgatgc atgaggctct gcââââââ 1440
tacâââââ agââââââ cctgtctccg ggââââ 1476

```

<210> 40

<211> 492

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 40

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 Thr Ser Glu Asn
35 40 45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300

ES 2 460 517 T3

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 41

<211> 1476

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 41

atggaagcac cagcgagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt	60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
-ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct	180

ES 2 460 517 T3

```

ggccagggtc ctaggtcct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240
aggttcagtg gcagtggtac cgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggctcggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
ggggctagcg aggtgcagct ggtggagtct ggtggaggct ctgtccagcc tggagggtcc 480
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc 540
cgccagatgc cgggaaaagg cctggagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatggtggt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgcatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcgccaccc tggtcactgt ctctcagc 780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gccagcacc tgaactcctg 840
ggtggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 900
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagcccg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg 1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc 1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1476

```

<210> 42

<211> 492

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 42

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe 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

```

ES 2 460 517 T3

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 43

<211> 1476

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 43

atggaagcac cagcgagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc 120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
ggggctagcg aggtgcagct ggtggagtct ggtggaggct ctgtccagcc tggagggtcc 480
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc 540
cgccagatgc ccgggaaagg cctggagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatggtggt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcggcaccc tggtcactgt ctccctcagc 780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccacgt gccagcacc tgaactcctg 840
ggtggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 900
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggagggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc 1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
cccgctctgg actccgacgg ctcttctctt ctctacagca agctcacctg ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1476

```

<210> 44

<211> 492

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 44

```

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

```

ES 2 460 517 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 Thr Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270

ES 2 460 517 T3

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 45

<211> 1482

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 45

ES 2 460 517 T3

```

atggaagbcc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc 120
ctctcctgcc gagcaagtca aagtgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ctaggctcct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240
aggttcagtg gcagtggtac cgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
gggaccgggt aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagtct 480
ctgaagattt cctgtaaggg atccgggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg 540
cgccagatgc cggggaaagg cctcgagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatggtggt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgccgaca gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cggggcaccc tggtcactgt ctctctgat 780
caggagccca aatcttctga caaaactcac acatctccac cgtgcccagc acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc 900
cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 960
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag 1020
cagtacaaca gcagctaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1080
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gcccccatcc 1200
cgggatgagc tgaccaagaa ccaagtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatcca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccagc 1320
cctcccgctg tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac 1440
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaa at ga 1482

```

<210> 46

<211> 493

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 46

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

ES 2 460 517 T3

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 Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	50	55	60
Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala	65	70	75
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 His His Ser	100	105	110
Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly	115	120	125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu	130	135	140
Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser	145	150	155
Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn	165	170	175
Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly	180	185	190
Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys	195	200	205
Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu	210	215	220
Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala	225	230	235
Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr	245	250	255

ES 2 460 517 T3

Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
260 265 270

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
275 280 285

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
290 295 300

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
450 455 460

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 47

<211> 1500

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 47

```

.aagcttgccg ccattggaagc cccagcgcag cttctcttcc tcctgtact ctggctccca 60
gataccaccg gagaaattgt gttgacacag tctccagcca ccctgtcttt gtctccaggc 120
gaaagagcca ccctctcctg ccgagcaagt gaaaatgttt acagctactt agcctggtac 180
caacagaaac ctggccaggc tcctaggctc ctcatctatt ttgcaaaaac cttagcagaa 240
ggaattccag ccaggttcag tggcagtgga tccgggacag acttcactct caccatcagc 300
agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcaac atcattccga taatccgtgg 360
acattcggcc aagggaacca ggtggaaatc aaaggtggcg gcggctcggg cgggtggtgga 420
tctggaggag gtgggaccgg tgaggtgcag ctggtgcagt ctggagcaga ggtgaaaaag 480
cccgagagat ctctgaagat ttctgttaag ggatccggtt actcattcac tggctacaat 540
atgaactggg tgcgccagat gcccgggaaa ggctcagat ggatgggcaa tattgatcct 600
tattatggtg gtactaccta caaccggaag ttcaagggcc aggtcactat ctccgccgac 660
aagtccatca gcaccgcta cctgcaatgg agcagcctga aggcctcgga caccgccatg 720
tattactgtg cagctcagt cggcccttcc gactactggg gccagggcac cctggtcact 780
gtctcctctg atcaggagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtgccca 840
gcactgaac tcctgggtgg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 900
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccaagaagac 960
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1020
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1080
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc 1140
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1200
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa 1260
ggcttctatc caagcgacat cggcgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1320
tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttctctca cagcaagctc 1380
accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1440
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atgatctaga 1500

```

<210> 48

<211> 493

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 48

ES 2 460 517 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 Glu Asn
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240

ES 2 460 517 T3

Arg Ser Val Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 49
 <211> 356
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TRU-016 humanizado

10 <400> 49

ES 2 460 517 T3

gctagcgagg tgcagctggt gcagtctgga gcagaggtga aaaagcccg agagtctctg 60
aagatttcct gtaagggatc cggttactca ttcactggct acaatatgaa ctgggtgctg 120
cagatgcccc ggaaaggcct ggagtggatg ggcaatattg atccttatta tgggtgtact 180
acctacaacc ggaagttcaa gggccaggtc actatctccg ccgacaagtc catcagcacc 240
gcctacctgc aatggagcag cctgaaggcc tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgcgc 300
tcagtcggcc ctatggacgt ctggggccaa ggcaccactg tcactgtctc ctcgag 356

<210> 50

5 <211> 143

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> TRU-016 humanizado

<400> 50

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 Glu Asn
35 40 45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
100 105 110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115 120 125

15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly
130 135 140

<210> 51

<211> 1381

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

25

<400> 51

ES 2 460 517 T3

```

aagcttgccg ccatggaagc cccagegcag cttctcttcc tctgctact ctggctccca 60
gataccaccg gagaaattgt gttgacacag tctccagcca ccctgtcttt gtctccaggc 120
gaaagagcca ccctctcctg ccgagcaagt gaaaatgttt acagctactt agcctggtac 180
caacagaaac ctggccaggc tcttaggctc ctcctctatt ttgcaaaaac cttagcagaa 240
ggaattccag ccagggttcag tggcagtgga tccgggacag acttcactct caccatcagc 300
agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcaac atcattccga taatccgtgg 360
acattcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaagggtggc gtggctcggg cgggtggtgga 420
tctggaggag gtgggaccgg tgagggtgcag ctggtgcagt ctggagcaga ggtgaaaaag 480
cccgagagat ctctgaagat ttctgtaag ggatccggtt actcattcac tggctacaat 540
atgaactggg tgcgccagat gcccgggaaa ggcctcgagt ggatgggcaa tattgatcct 600
tattatggtg gtactaccta caaccggaag ttcaagggcc aggtcactat ctccgccgac 660
aagtccatca gcaccgccta cctgcaatgg agcagcctga aggcctcgga caccgccatg 720
tattactgtg cagctcagt cggcccttct gactcctggg gccaggggac cctgggtcact 780
gtctcctctg atcaggagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtgcccc 840
gcacctgaac tctgggtgg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 900
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 960
cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag 1020
ccgcgaggag agcagtagaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1080
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc 1140
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1200
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagggtc gcctgacctg cctgggtcaa 1260
ggcttctatc caagcgacat cgcctggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1320
tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttctctca cagcaagctc 1380
a 1381

```

<210> 52
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TRU-016 humanizado

<400> 52

ES 2 460 517 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 Glu Asn
35 40 45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
100 105 110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
130 135 140

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
145 150 155 160

Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
165 170 175

Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
180 185 190

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
195 200 205

Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
210 215 220

ES 2 460 517 T3

Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240

Arg Ser Val Gly Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255

Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

- 5 <210> 53
 <211> 356
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
 <223> TRU-016 humanizado

<400> 53

gctagcgcagg tgcagctggg gcagctctgga gcagaggtga aaaagcccg agagtctctg 60
aagatttcct gtaagggatc cgggttactca ttacttggtt acaatatgaa ctgggtgcgc 120
cagatgcccc ggaaggccct ggagtggtatg ggcaatattg atccttatta tgggtgtact 180
acctacaacc ggaagttcaa gggccaggtc actatctccg ccgacaagtc catcagcacc 240
gcctacctgc aatggagcag cctgaaggcc tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgcgc 300
tcagtcggcc cttttgacct ctggggccaa ggcacctgg tcactgtctc ctgcag 356

<210> 54

<211> 143

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 54

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 Glu Asn
35 40 45
Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60
Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
100 105 110
Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly
130 135 140

<210> 55

<211> 356

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 55

ES 2 460 517 T3

gctagcgagg tgcagctggt gcagtctgga gcagaggtga aaaagcccgg agagtctctg 60
aagatttcct gtaagggatc cggttactca ttcactggct acaatatgaa ctgggtgcgc 120
cagatgcccg ggaaaggcct ggagtggatg ggcaatattg atccttatta tgggtgtact 180
acctacaacc ggaagttcaa gggccaggtc actatctccg ccgacaagtc catcagcacc 240
gcctacctgc aatggagcag cctgaaggcc tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgcgc 300
tcagtcggcc cttttcagca ctggggccaa ggcaccctcg tcactgtctc ctcgag 356

<210> 56

<211> 143

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 56

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 Glu Asn
35 40 45
Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60
Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
100 105 110
Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly
130 135 140

15

<210> 57

<211> 356

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

25

<400> 57

ES 2 460 517 T3

```

gctagcgagg tgcagctggg gcagctctgga gcagaggtga aaaagcccg agagtctctg   60
aagatttcct gtaagggatc cgggttactca ttcactggct acaatatgaa ctgggtgcgc   120
cagatgcccg ggaaaggcct ggagtggatg ggcaatattg atccttatta tgggtgtact   180
acctacaacc ggaagttcaa gggccaggtc actatctccg ccgacaagtc catcagcacc   240
gcctacctgc aatggagcag cctgaaggcc tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgcgc   300
tcagtcggcc cttttgacgt ctggggccaa ggcaccatgg tcactgtctc ctgcag   356

```

<210> 58
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TRU-016 humanizado

<400> 58

```

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 Glu Asn
35          40          45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
100         105         110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115         120         125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly
130         135         140

```

<210> 59
 <211> 356
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TRU-016 humanizado

<400> 59

ES 2 460 517 T3

```

gctagcgagg tgcagctggg gcagtctgga gcagaggtga aaaagcccgg agagtctctg      60
aagatttcct gtaagggatc cggttactca ttcactggct acaatatgaa ctgggtgcgc      120
cagatgcccg ggaaaggcct ggagtggatg ggcaatattg atccttatta tggtggtact      180
acctacaacc ggaagttcaa gggccaggtc actatctccg ccgacaagtc catcagcacc      240
gcctacctgc aatggagcag cctgaaggcc tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgcgc      300
tcagtcggcc cttttgacat ctggggccaa ggcaccatgg tcaactgtctc ctcgag      356

```

<210> 60

<211> 143

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 60

```

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 Glu Asn
          35          40          45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Ser
          100          105          110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
          115          120          125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly
          130          135          140

```

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 61

```

Arg Ala Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala
1          5          10

```

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 62
 10
 Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 63
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 20 <400> 63
 Gly Tyr Asn Met Asn
 1 5
 25 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 64
 Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu
 1 5
 35 <210> 65
 <211> 18
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 45 <400> 65
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
 1 5 10 15
 Lys Gly
 <210> 66
 50 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 66

Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> 67
<211> 7
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TRU-016 humanizado
10
<400> 67

Ser Val Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5

15 <210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> TRU-016 humanizado

<400> 68

Ser Val Gly Pro Phe Asp Ser
1 5

25 <210> 69
<211> 7
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> TRU-016 humanizado

35 <400> 69

Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr
1 5

40 <210> 70
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> TRU-016 humanizado

<400> 70

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
20

50 <210> 71
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> TRU-016 humanizado

<400> 71

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
20 25 30

5

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 72

15

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 73

<211> 14

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

25

<400> 73

Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

30

<210> 74

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 74

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

40

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 75

<211> 32

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

50

<400> 75

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

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 76

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

10

<400> 76

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

15 <210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 77

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

35 <400> 78

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión específica a CD37 humanizada para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B, donde la proteína de unión específica a CD37 humanizada comprende:

(a) regiones estructurales de cadena ligera humana, una cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, una cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, y una cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y

(b) regiones estructurales de cadena pesada humana, una cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, una cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, y una cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ó 68

que se caracteriza porque la proteína de unión específica a CD37 humanizada debe usarse en combinación con una proteína de unión específica a CD20.

2. Una proteína de unión específica a CD20 para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B que se caracteriza porque la proteína de unión específica a CD20 debe usarse en combinación con una proteína de unión específica a CD37 humanizada para uso en el tratamiento de un cáncer o enfermedad autoinmune de células B, donde la proteína de unión específica a CD37 humanizada comprende:

(a) regiones estructurales de cadena ligera humana, una cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, una cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, y una cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y

(b) regiones estructurales de cadena pesada humana, una cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, una cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, y una cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ó 68.

3. Un artículo de fabricación que comprende una proteína de unión específica a CD20 y una proteína de unión específica a CD37 humanizada para uso en el tratamiento de un cáncer o enfermedad autoinmune de células B, donde la proteína de unión específica a CD37 humanizada comprende:

(a) regiones estructurales de cadena ligera humana, una cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, una cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, y una cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y

(b) regiones estructurales de cadena pesada humana, una cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, una cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, y una cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ó 68.

4. La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, donde las cadenas ligeras CDR1, CDR2 y CDR3 de la proteína de unión específica a CD37 humanizada de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 61, 64 y 66, respectivamente; y

donde las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 63, 65 y 67, respectivamente.

5. La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, donde las cadenas ligeras CDR1, CDR2 y CDR3 de la proteína de unión específica a CD37 humanizada de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 61, 64 y 66, respectivamente; y

donde las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 63, 65 y 68, respectivamente.

6. La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:

una región estructural de cadena ligera humana seleccionada de las SEQ ID NOS: 170-172, 175, 179, 182, 184-188, 191, 194-198, 203 y 205-210; o

una región estructural de cadena pesada humana seleccionada de las SEQ ID NOS: 140, 141, 143-147, 150, 151, 154-163, 168 y 169.

7. La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:

5 una primera región estructural de cadena ligera (FR1) seleccionada de las SEQ ID NOS: 170-172, 175 y 177-181; una FR2 humana de la región estructural de cadena ligera seleccionada de las SEQ ID NOS: 182, 184-188 y 191; una FR3 humana de la cadena ligera seleccionada de las SEQ ID NOS: 194-198, 203 y 205; y una FR4 humana de la cadena ligera seleccionada de las SEQ ID NOS: 206-210; o

10 una primera región estructural (FR1) de cadena pesada humana seleccionada de las SEQ ID NOS: 140, 141 y 143-146; una FR2 humana de la cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NOS: 147, 150 y 151; una FR3 humana de la cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NOS: 154-160; y una FR4 humana de la cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NOS: 161-163, 168 y 169.

8. La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

15 donde la proteína de unión comprende un polipéptido Fv de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo o un fragmento de unión al mismo, o una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende, desde el extremo amino al carboxi, (i) un dominio de unión que tenga regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina separadas por un péptido de enlace, (ii) un polipéptido de región de bisagra de inmunoglobulina que tenga cero, uno o dos residuos de cisteína, y (iii) dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina.

20 **9.** La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de la reivindicación 8, donde el polipéptido de la región de bisagra de inmunoglobulina puede ser un polipéptido de región de bisagra de IgG1, IgGA o IgE o una IgG1 mutante.

25 **10.** La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, donde:

la proteína de unión es una proteína de fusión de inmunoglobulina de la reivindicación 8, que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada;

30 la región variable de cadena ligera está unida a la región variable de cadena pesada mediante un péptido de unión que comprende (Gly4SER)_n, donde n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6; y

las regiones variables de cadena ligera y pesada unidas están conectadas a un dominio efector IgG1 a través de una bisagra compuesta por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 115, 116, 118, 120, 122, 124, 126 ó 127.

35 **11.** La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la proteína de unión específica a CD37 humanizada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 48 y 52.

40 **12.** La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la proteína de unión específica a CD20 es un anticuerpo monoclonal específico de CD20.

13. La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo monoclonal específico de CD20 es Rituximab.

45 **14.** La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la proteína de unión específica a CD20 es una proteína de fusión de inmunoglobulina que es específica de CD20 y comprende, desde el extremo amino al carboxi, (i) un dominio de unión que tiene regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina separadas por un péptido de enlace, (ii) un polipéptido de región de bisagra de inmunoglobulina que tiene cero, uno o dos residuos de cisteína, y (iii) dominio CH2 y CH3 de inmunoglobulina.

50 **15.** La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de la reivindicación

14, donde el polipéptido de la región de bisagra de inmunoglobulina puede ser un polipéptido de región de bisagra de IgG1, IgGA o IgE o una IgG1 mutante.

5 **16.** La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica a CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el método comprende además el uso de un agente quimioterapéutico, un agente radioterapéutico, una citocina, una quimiocina o un factor de crecimiento.

10 **17.** La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica de CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el cáncer de células B es enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfomas del sistema nervioso central, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, leucemia mioblástica crónica, mieloma múltiple, linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal esplénica, mieloma de célula plasmática, plasmacitoma solitario de hueso, plasmacitoma extraóseo, linfoma de células B de zona marginal extra-nodal de tejido linfoide asociado a mucosa, linfoma de células B de zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de células manta, linfoma de células B grandes difusas, linfoma de células B grandes mediastinales (tímicas), linfoma de células B grande intravascular, linfoma de efusión primaria, linfoma/leucemia de Burkitt, proliferaciones de células B de potencial maligno incierto, granulomatosis linfomatoide o trastorno linfoproliferativo post-trasplante.

20 **18.** La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica de CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjogren, enfermedad de Grave, diabetes mellitus de tipo I, soriasis, púrpura trombocitopénica inmune, pénfigo, miopatía inflamatoria idiopática, miastenia gravis o macroglobinemia de Waldenstrom.

25 **19.** La proteína de unión específica a CD37 humanizada o la proteína de unión específica de CD20 o el artículo de fabricación para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune de células B de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la proteína de unión específica a CD37 y la proteína de unión específica a CD20 se administran secuencialmente en un periodo de aproximadamente 24 horas o se administran simultáneamente.

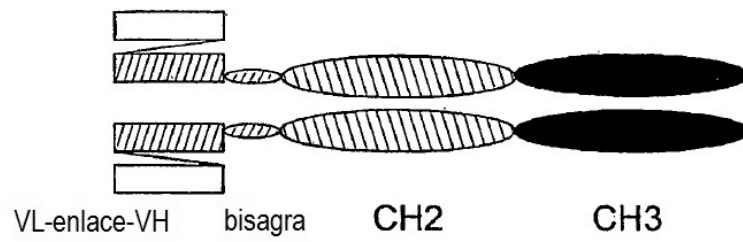


FIG. 1A

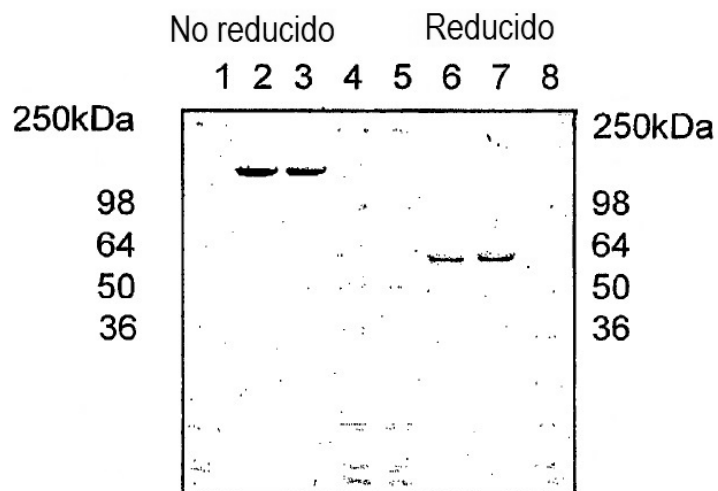


FIG. 1B

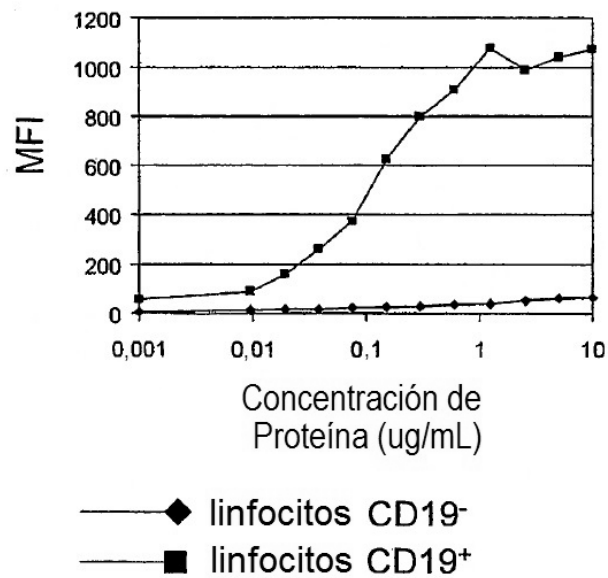


FIG. 1C

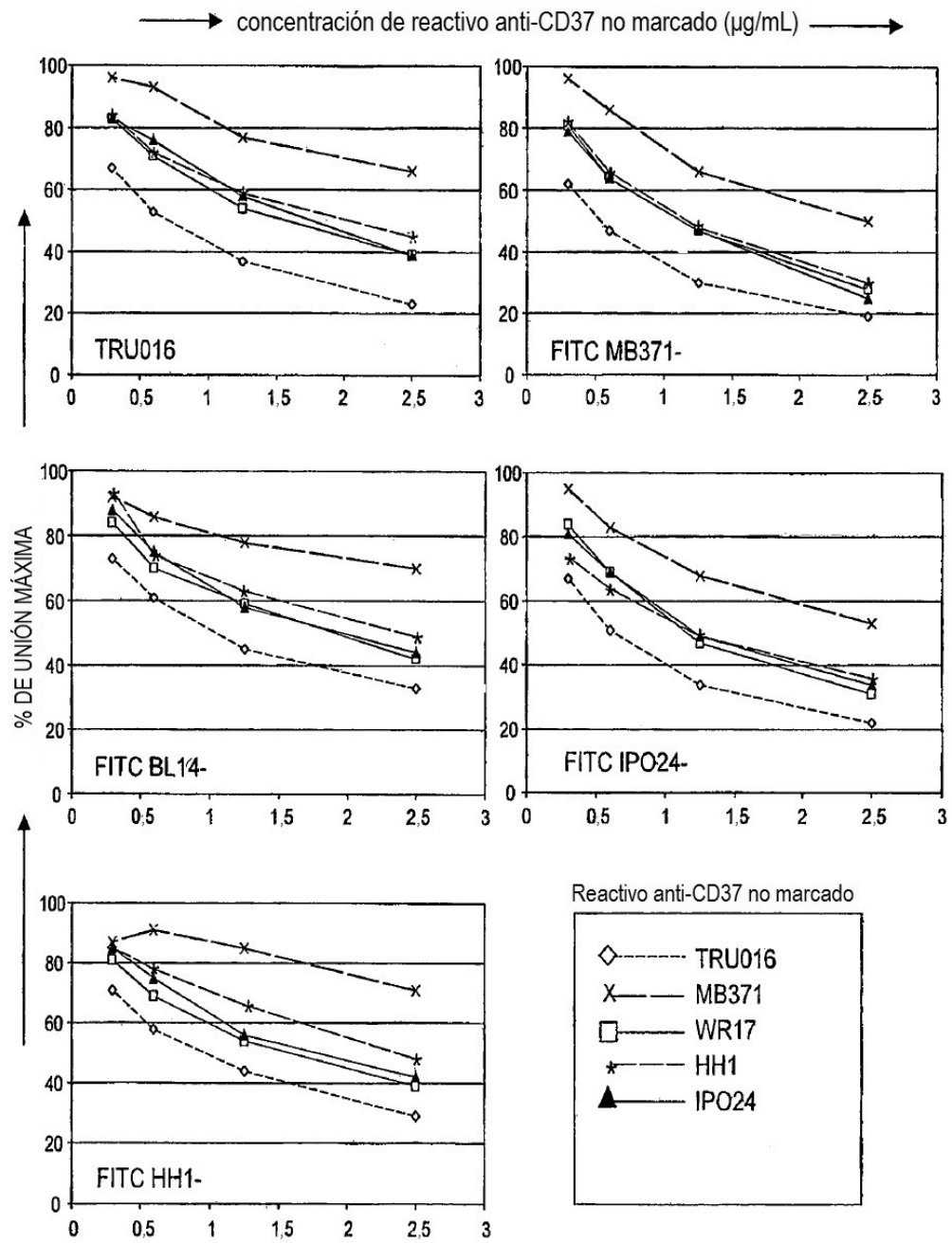


FIG. 2

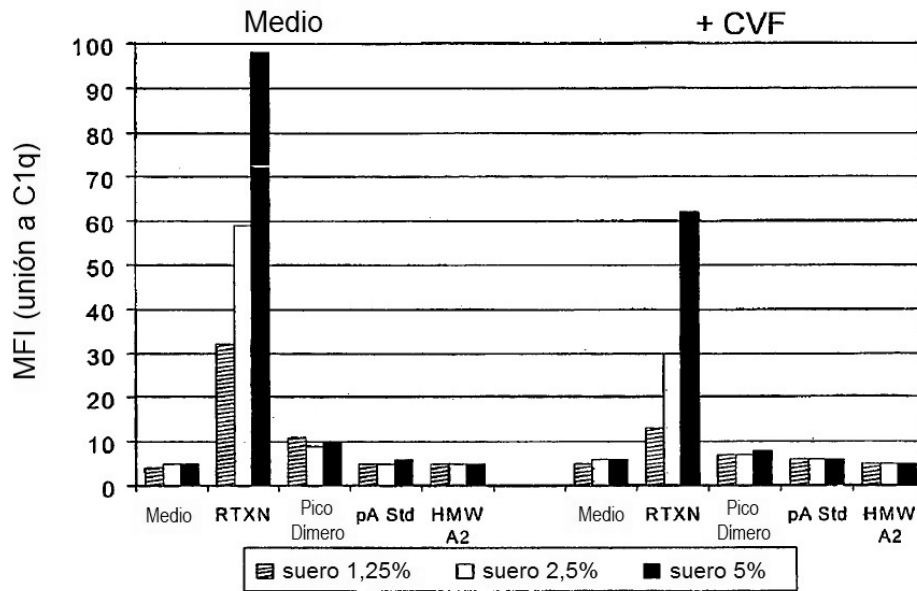


FIG. 3A

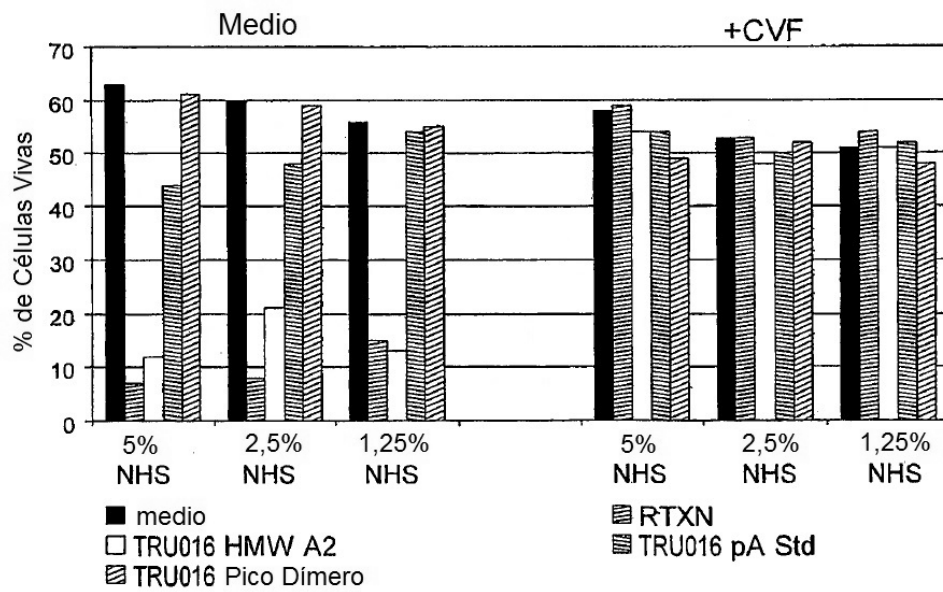


FIG. 3B

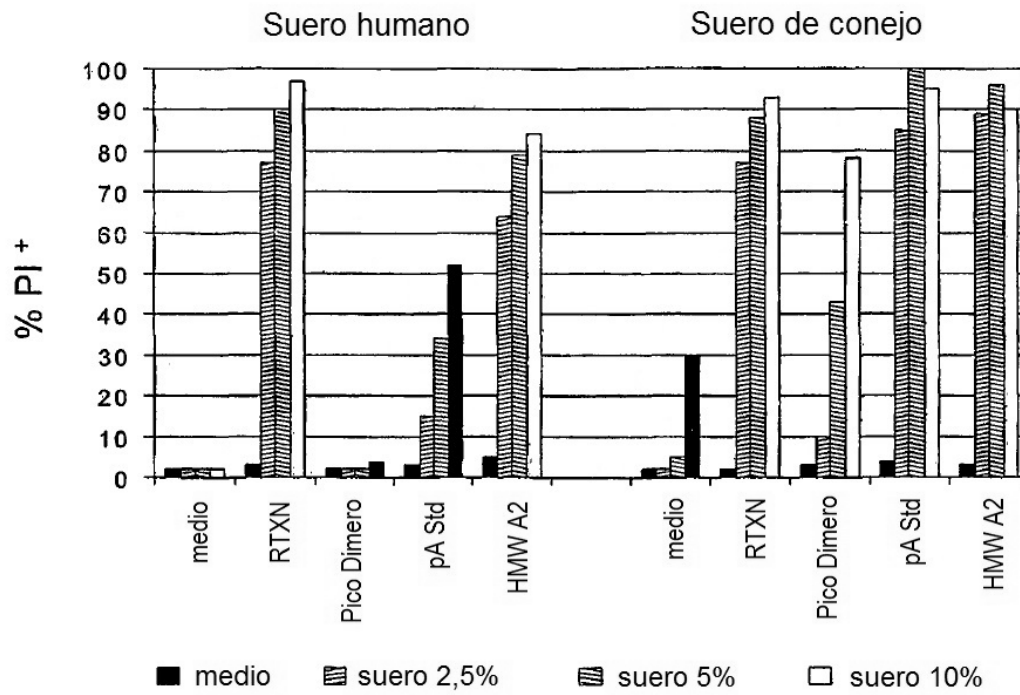


FIG. 3C

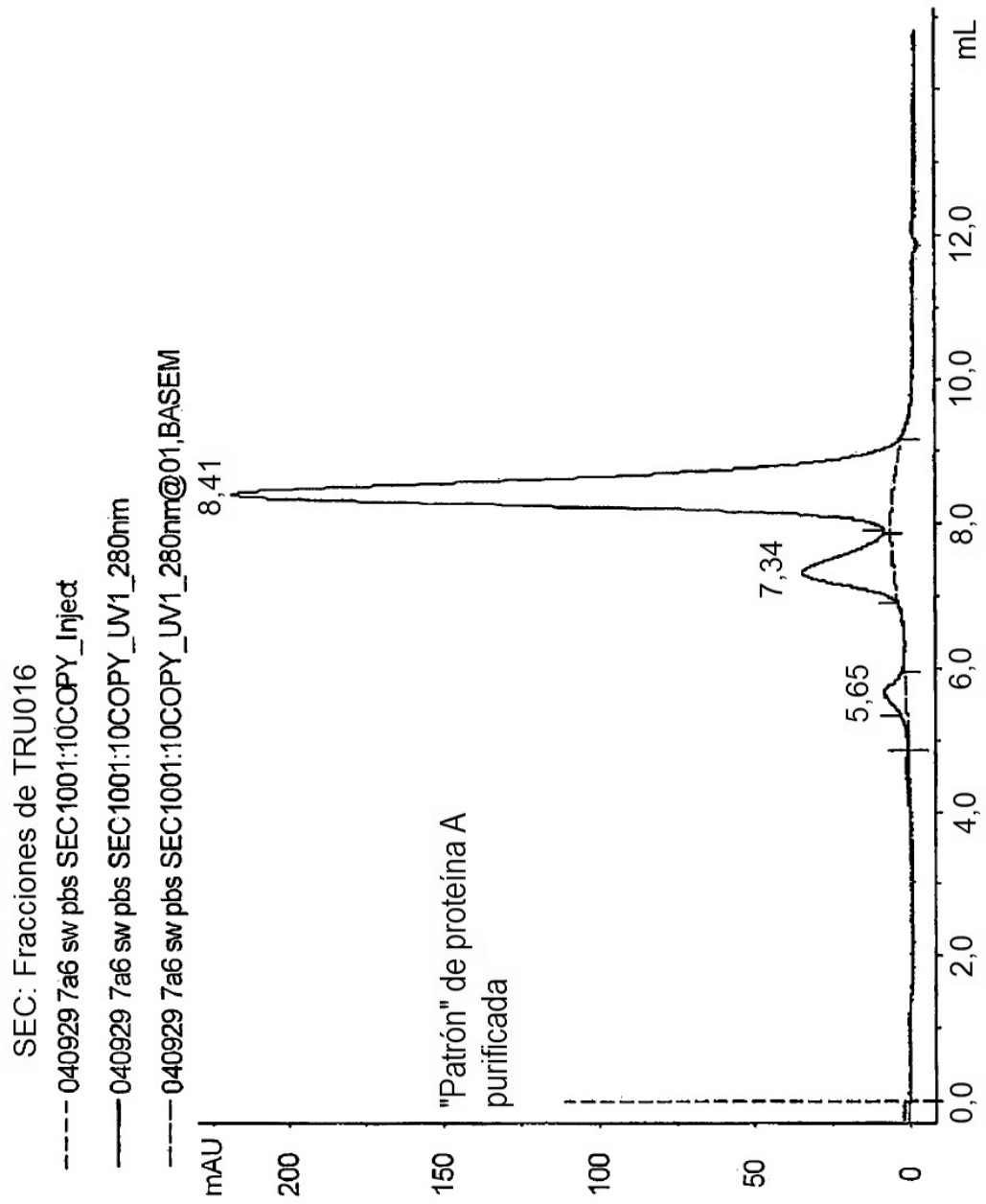


FIG. 4A

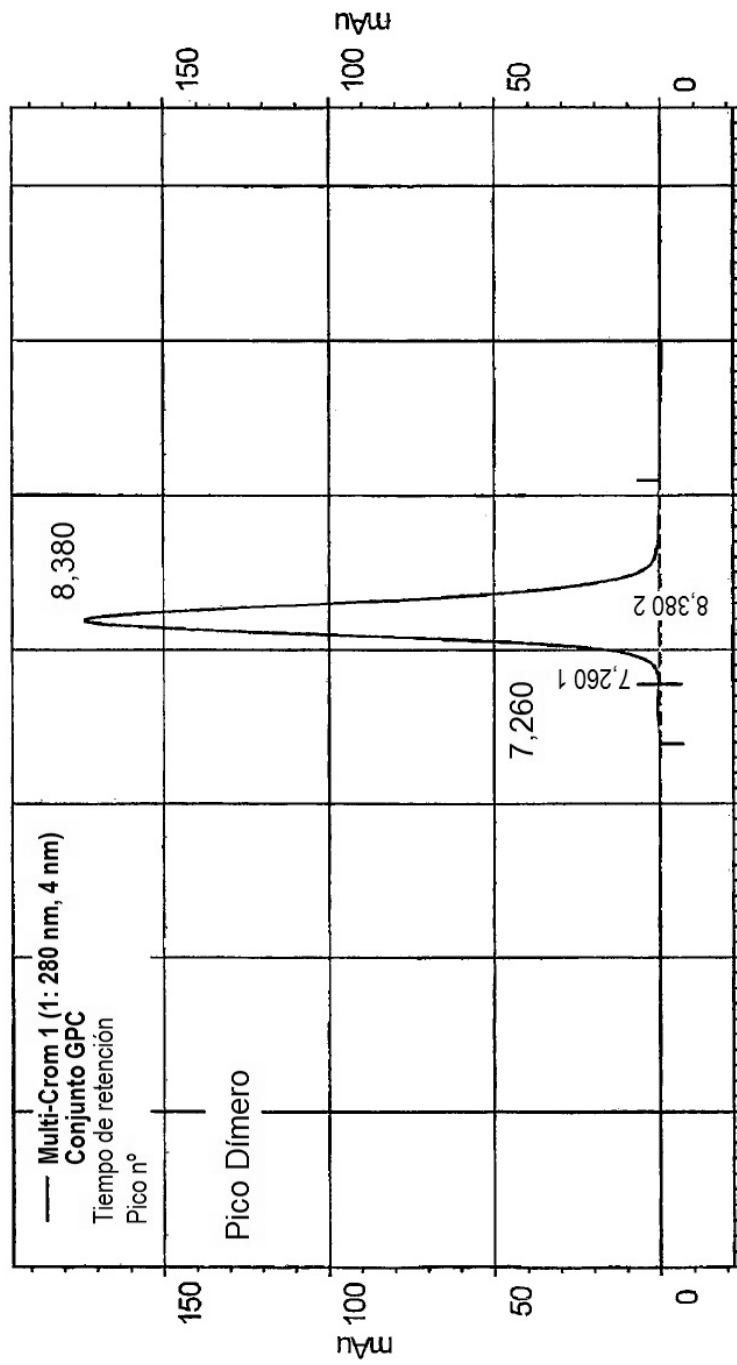


FIG. 4B

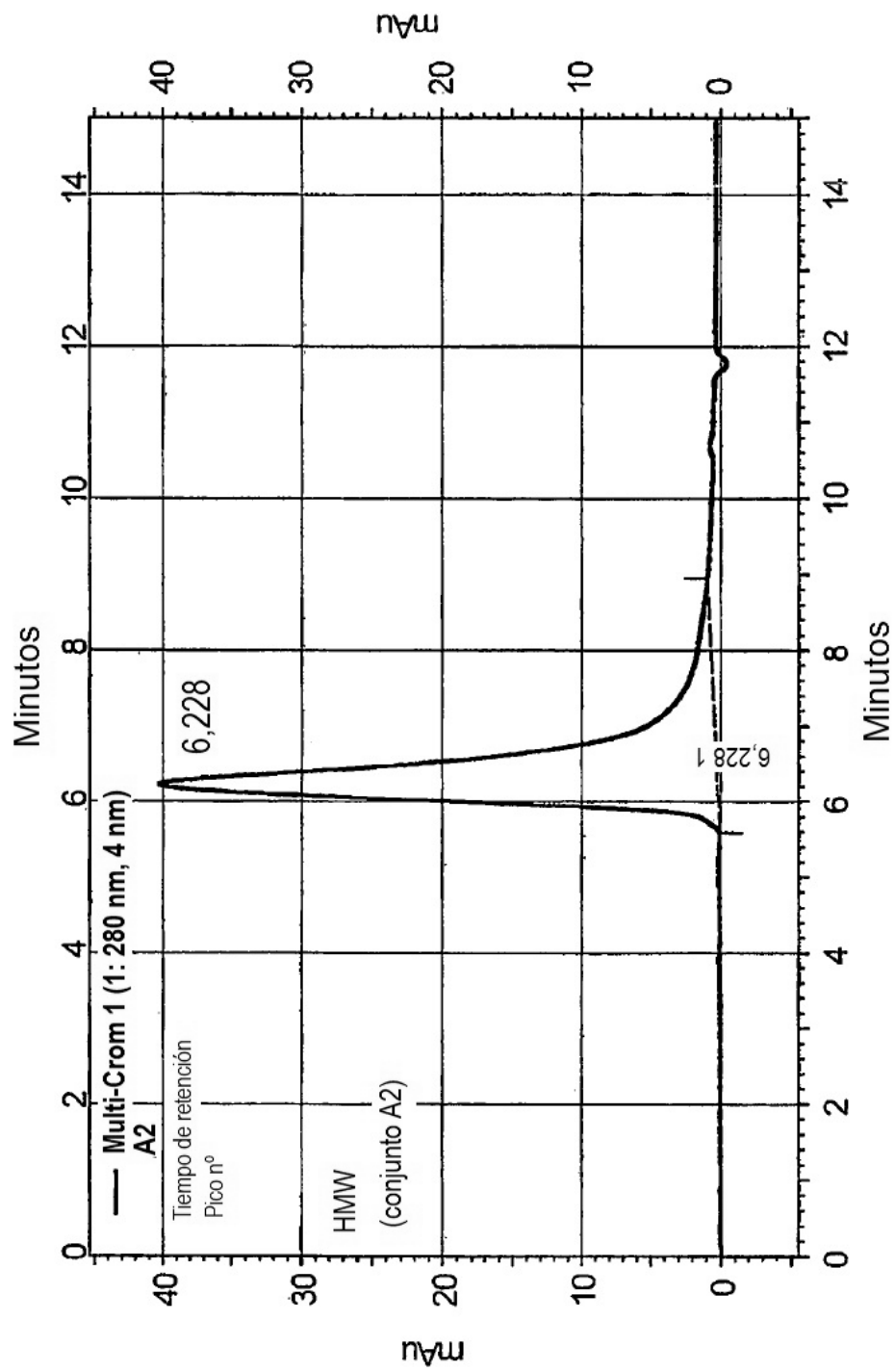


FIG. 4C

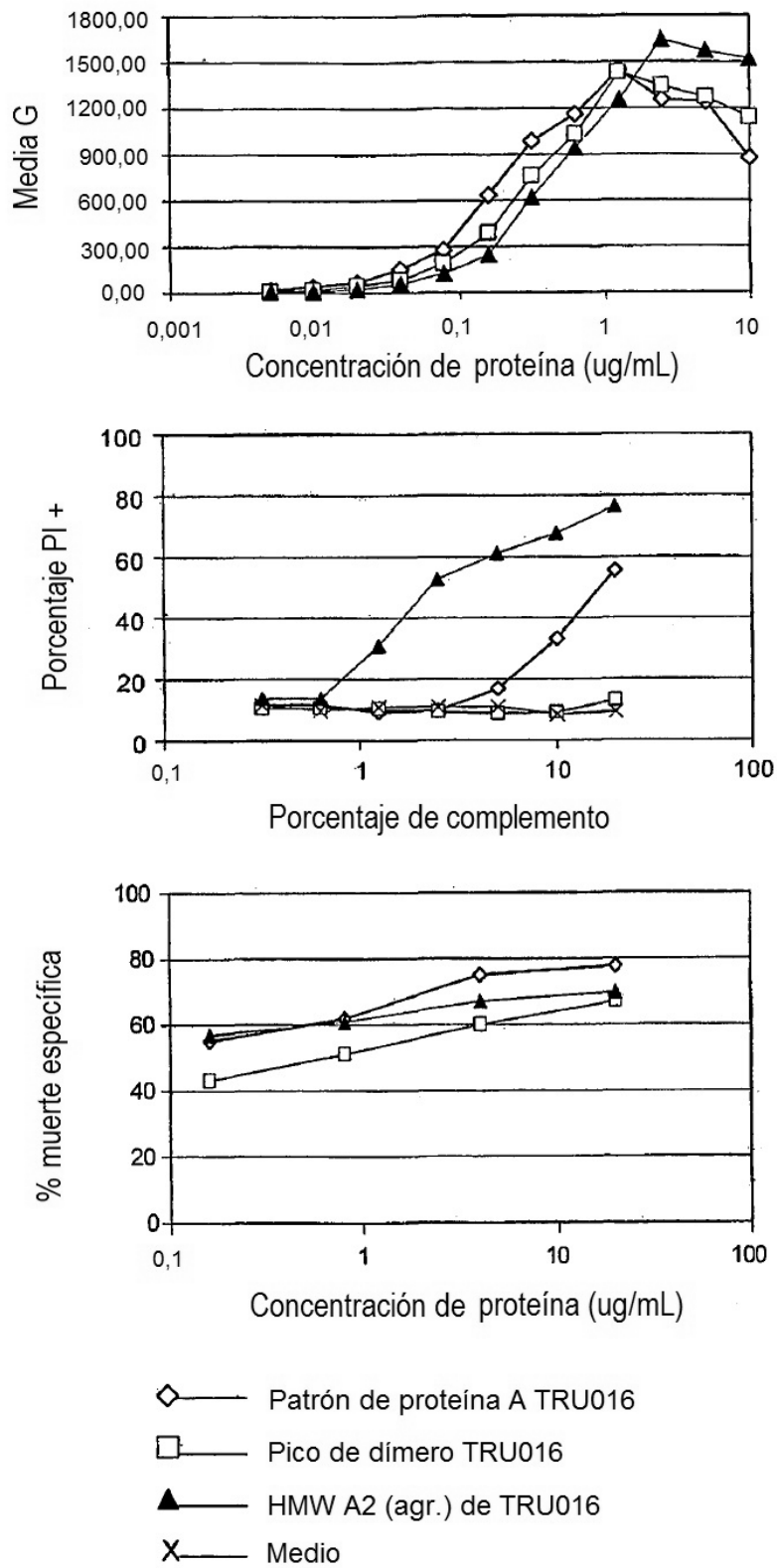


FIG. 5

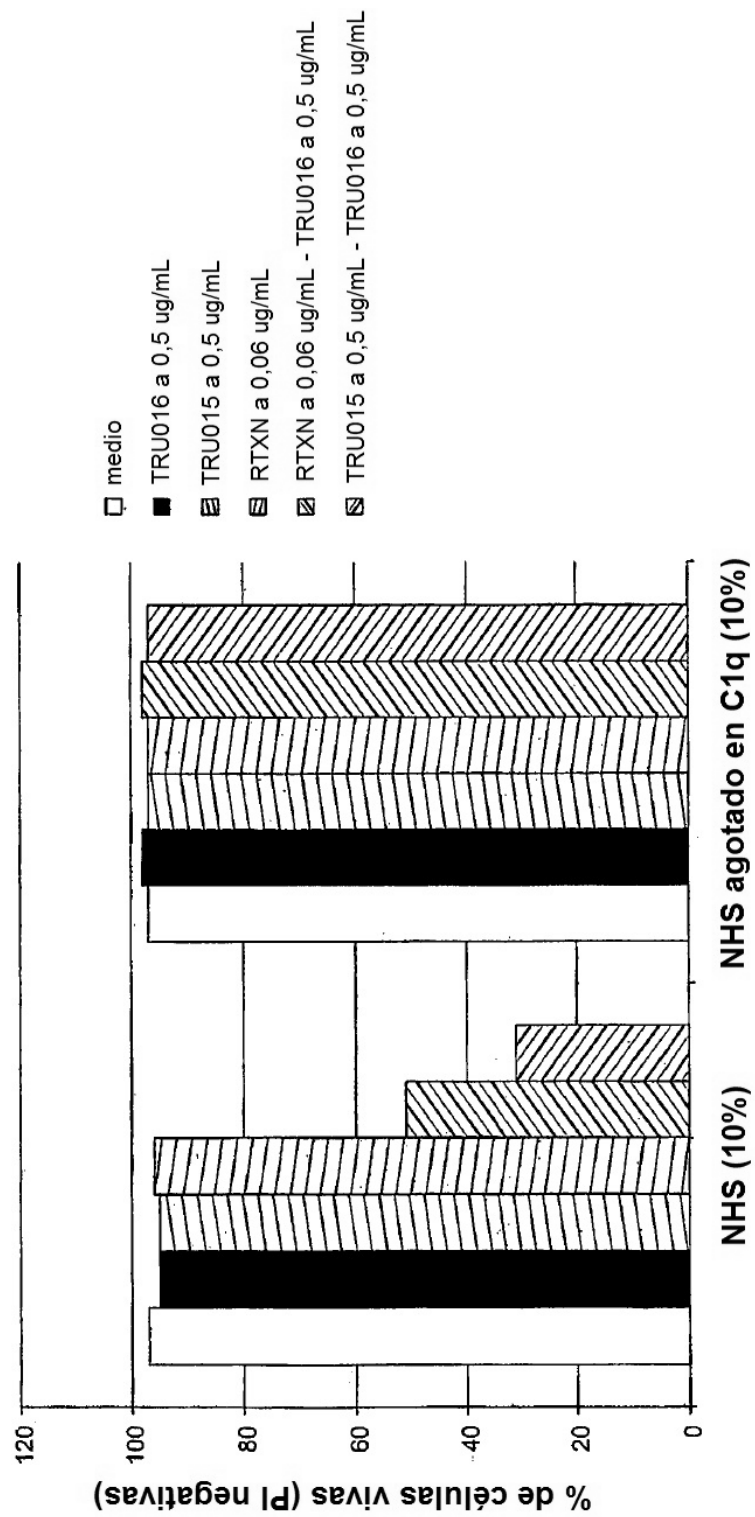


FIG. 6

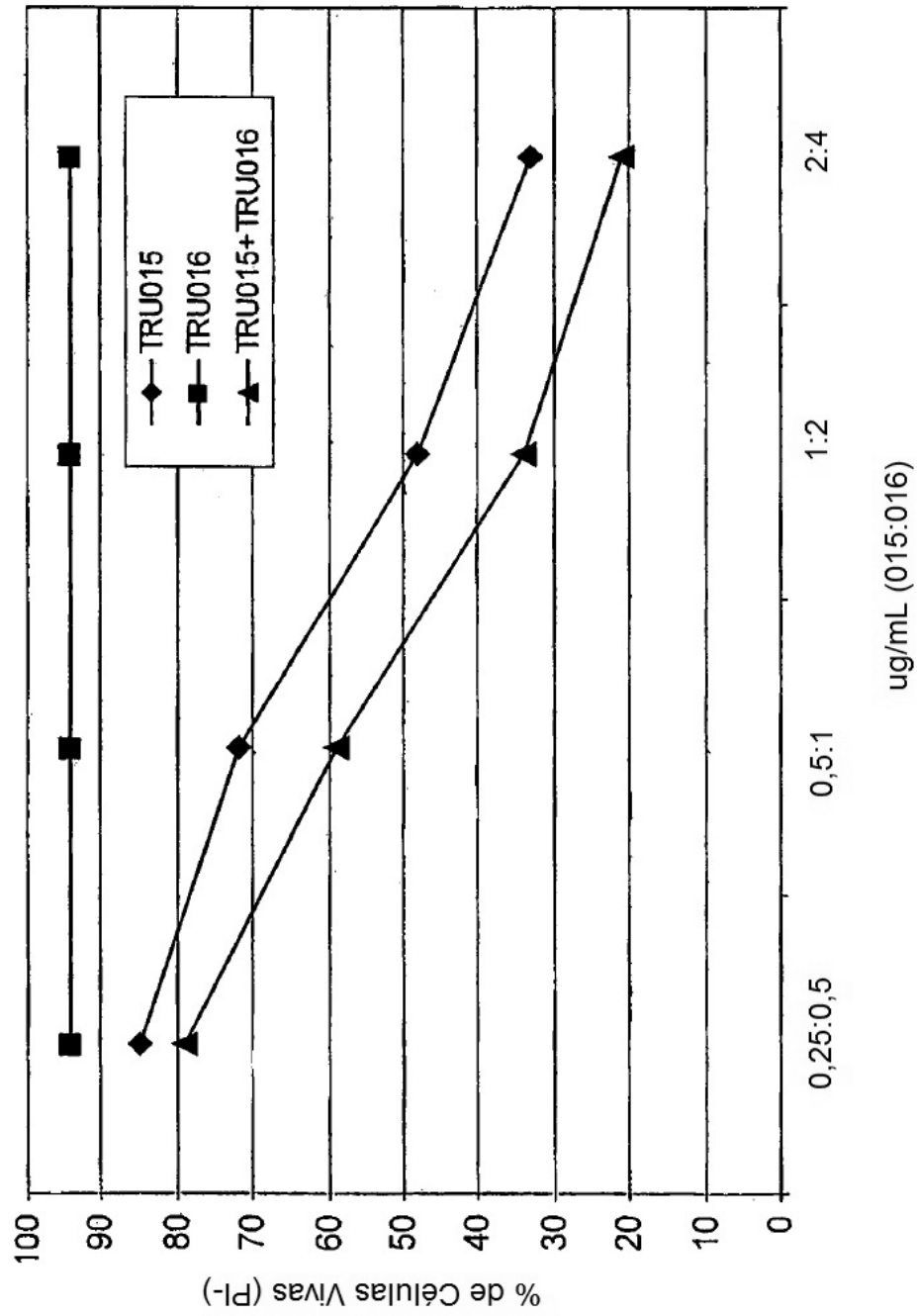


FIG. 7

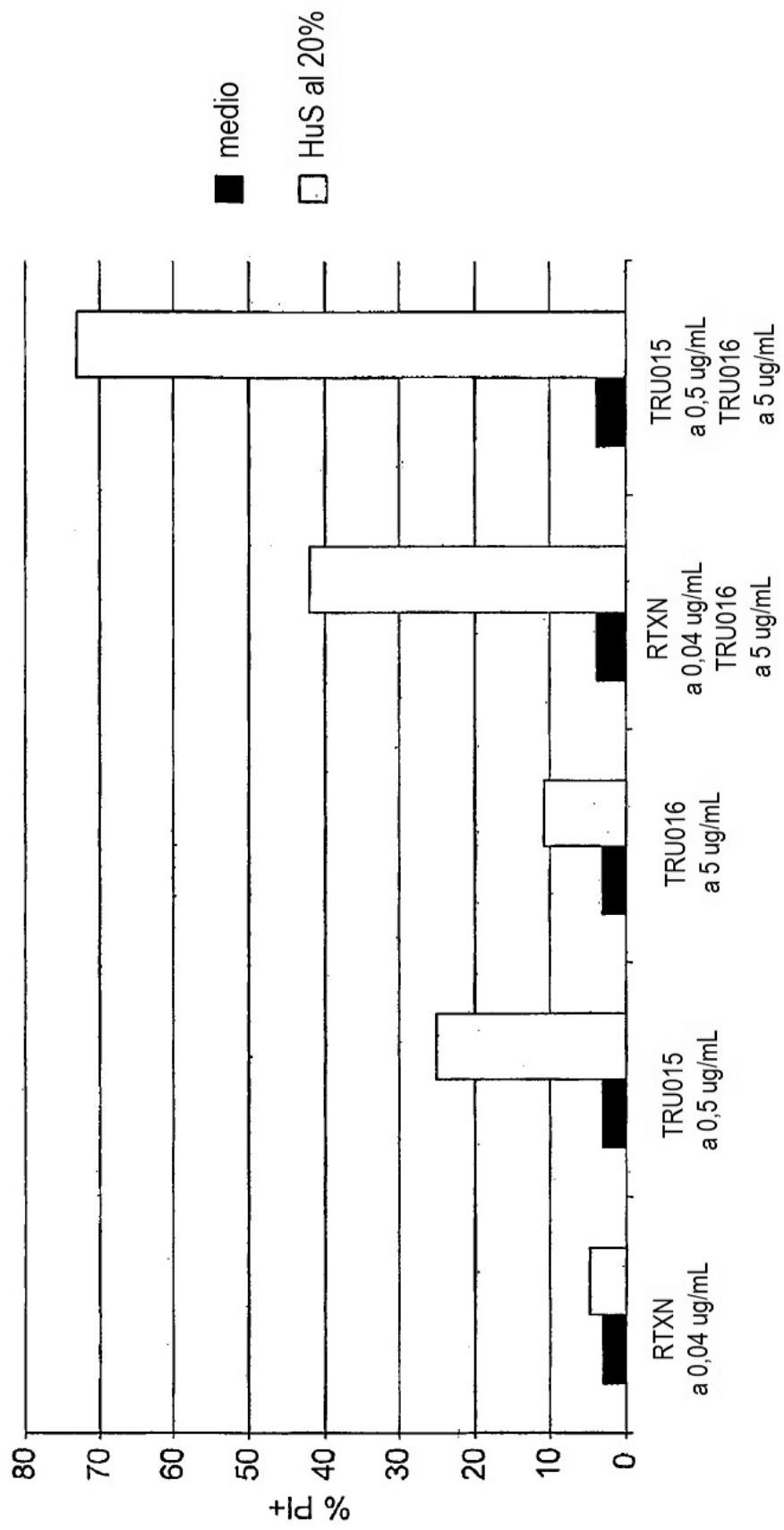


FIG. 8

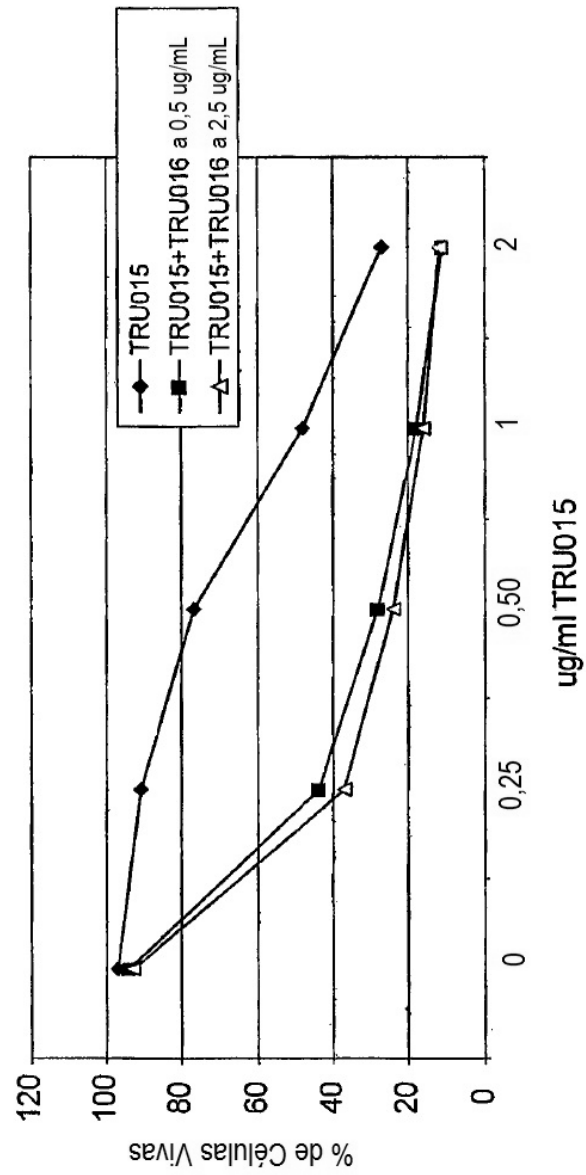


FIG. 9

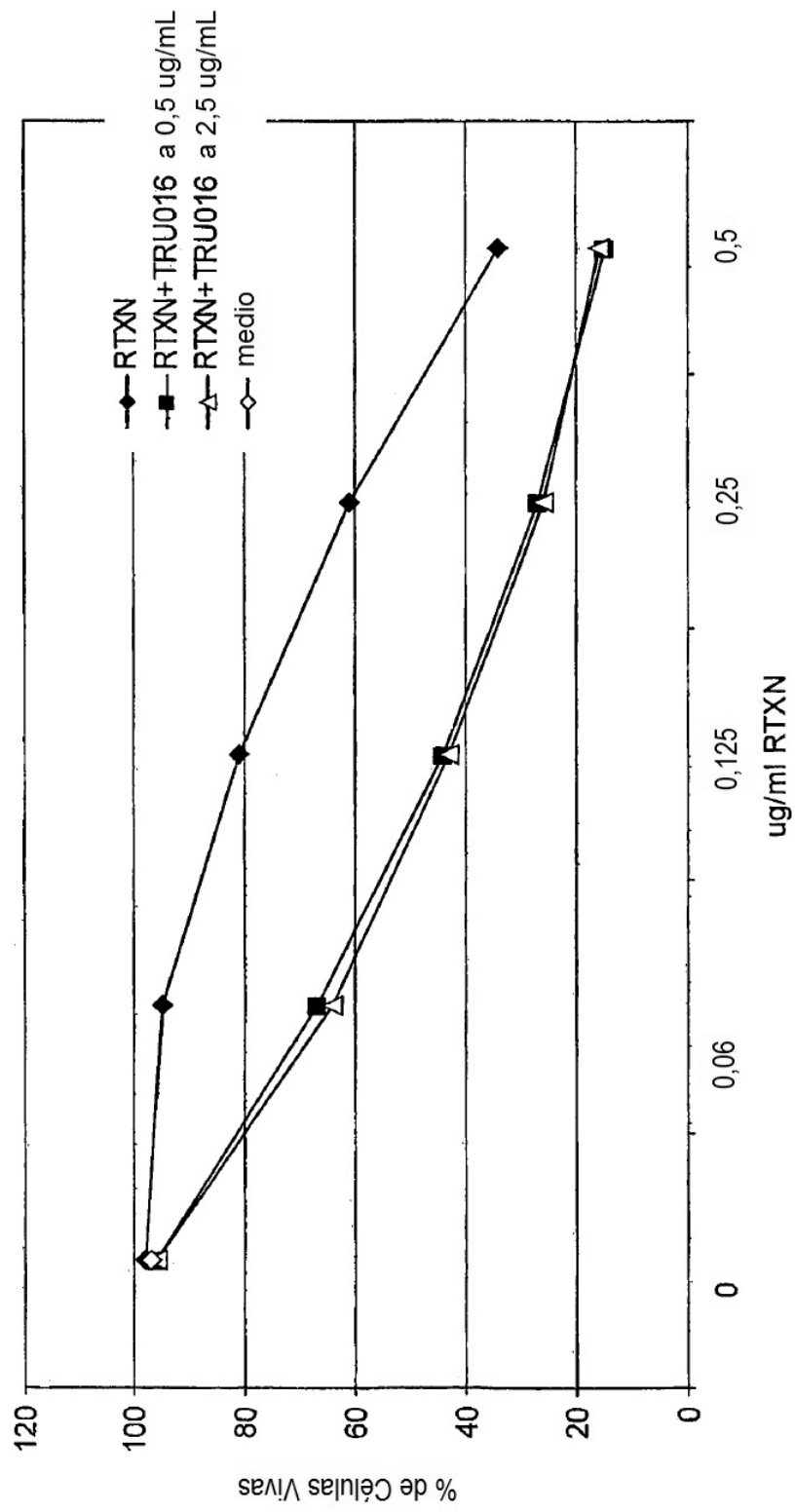


FIG. 10

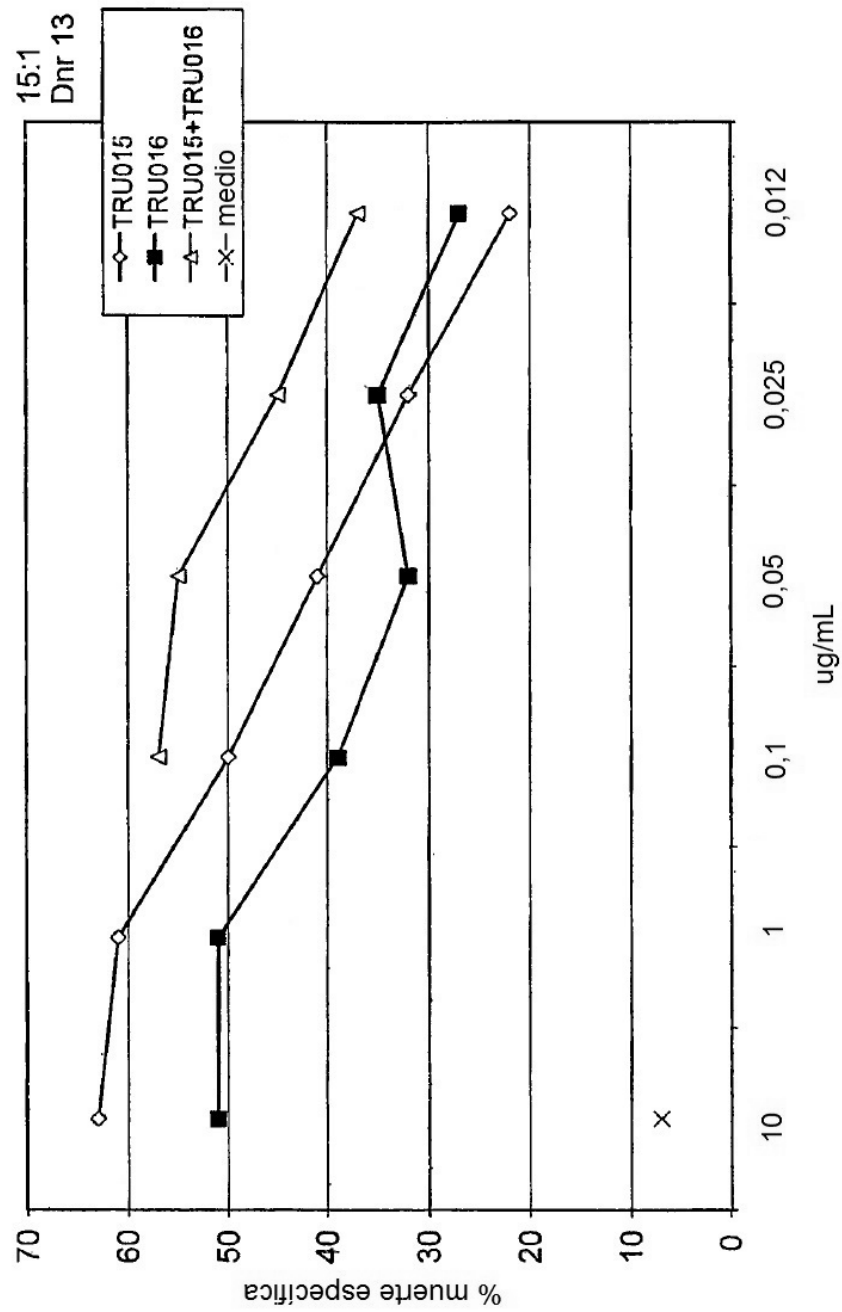


FIG. 11

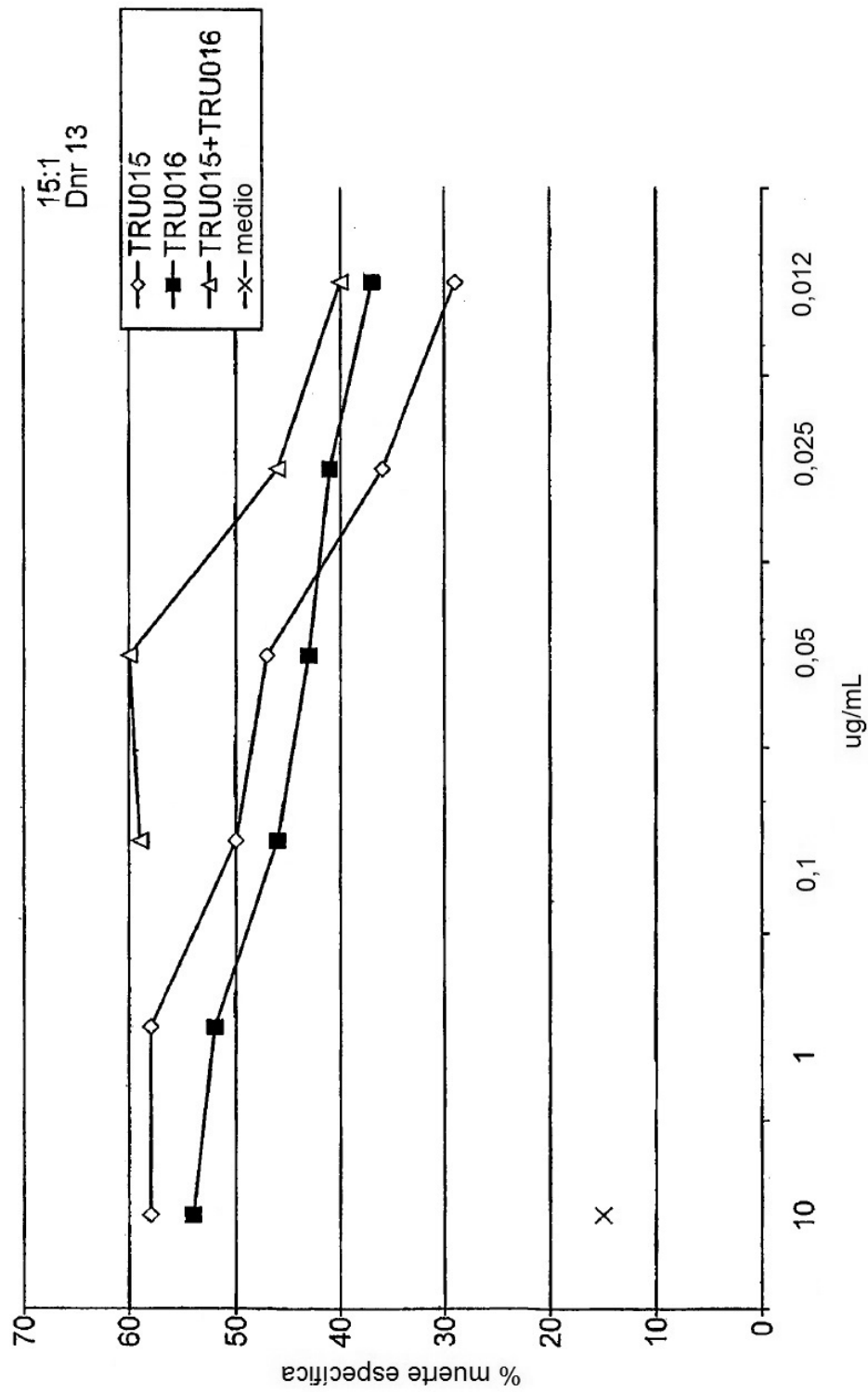


FIG. 12

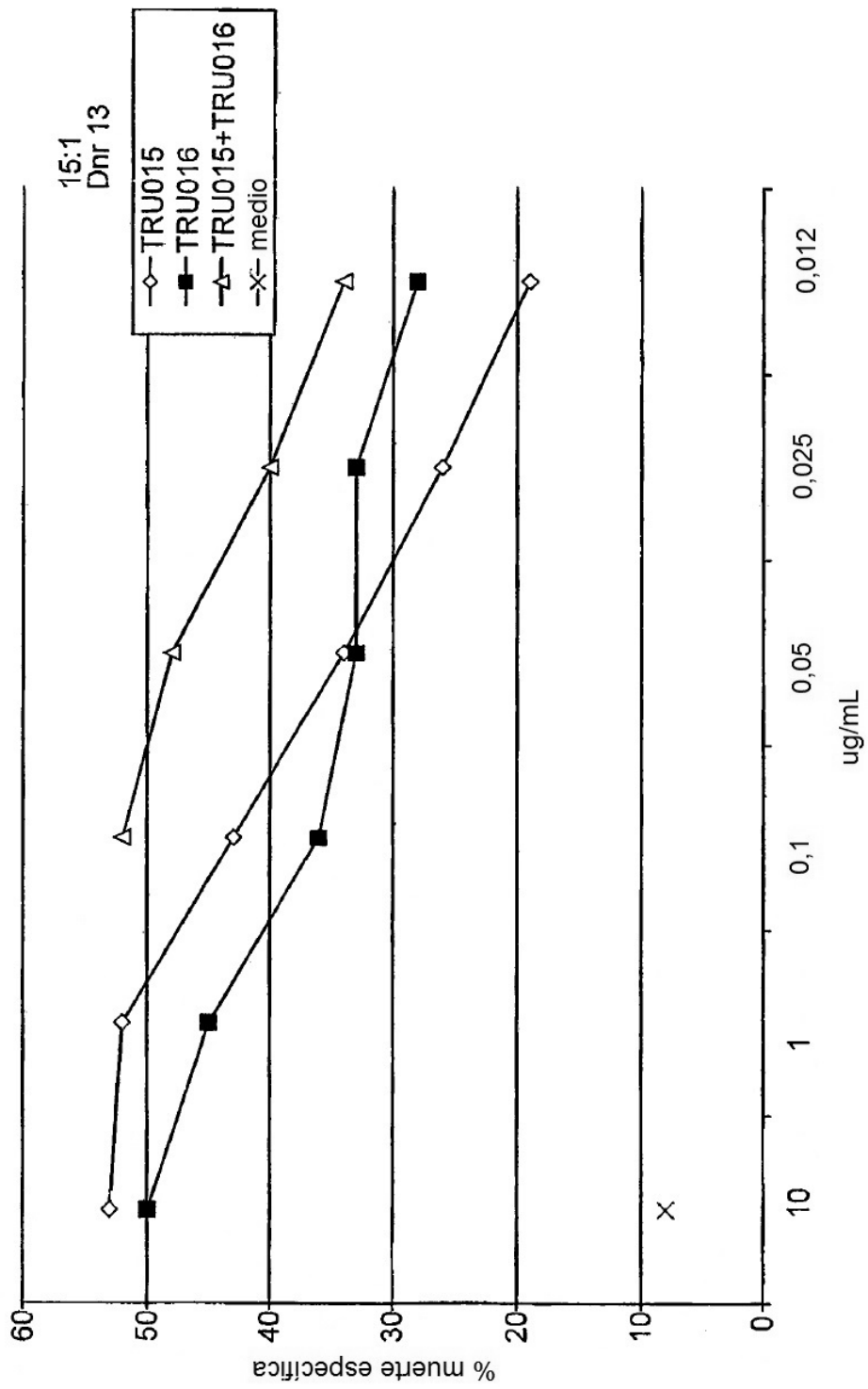


FIG. 13

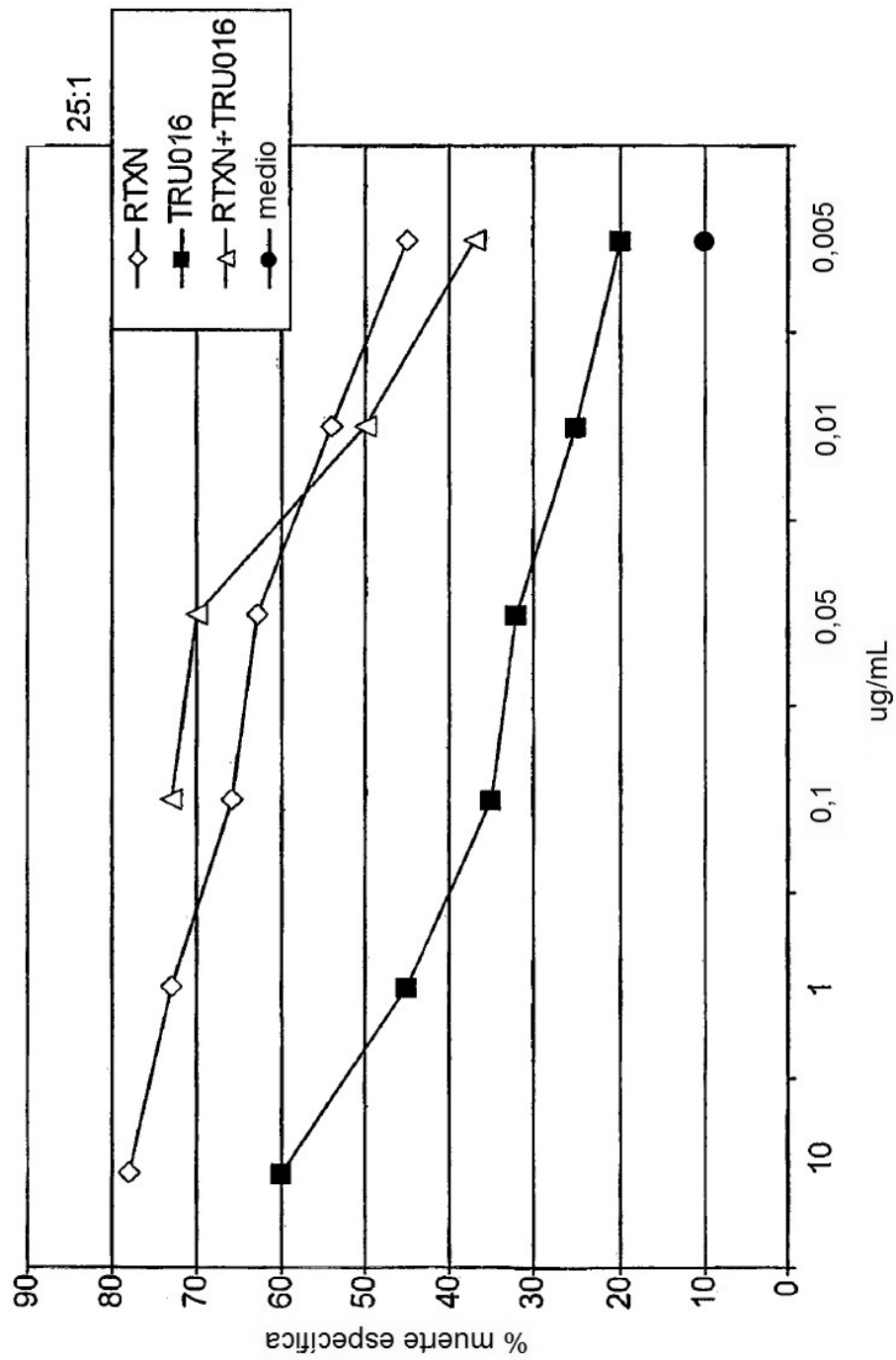


FIG. 14

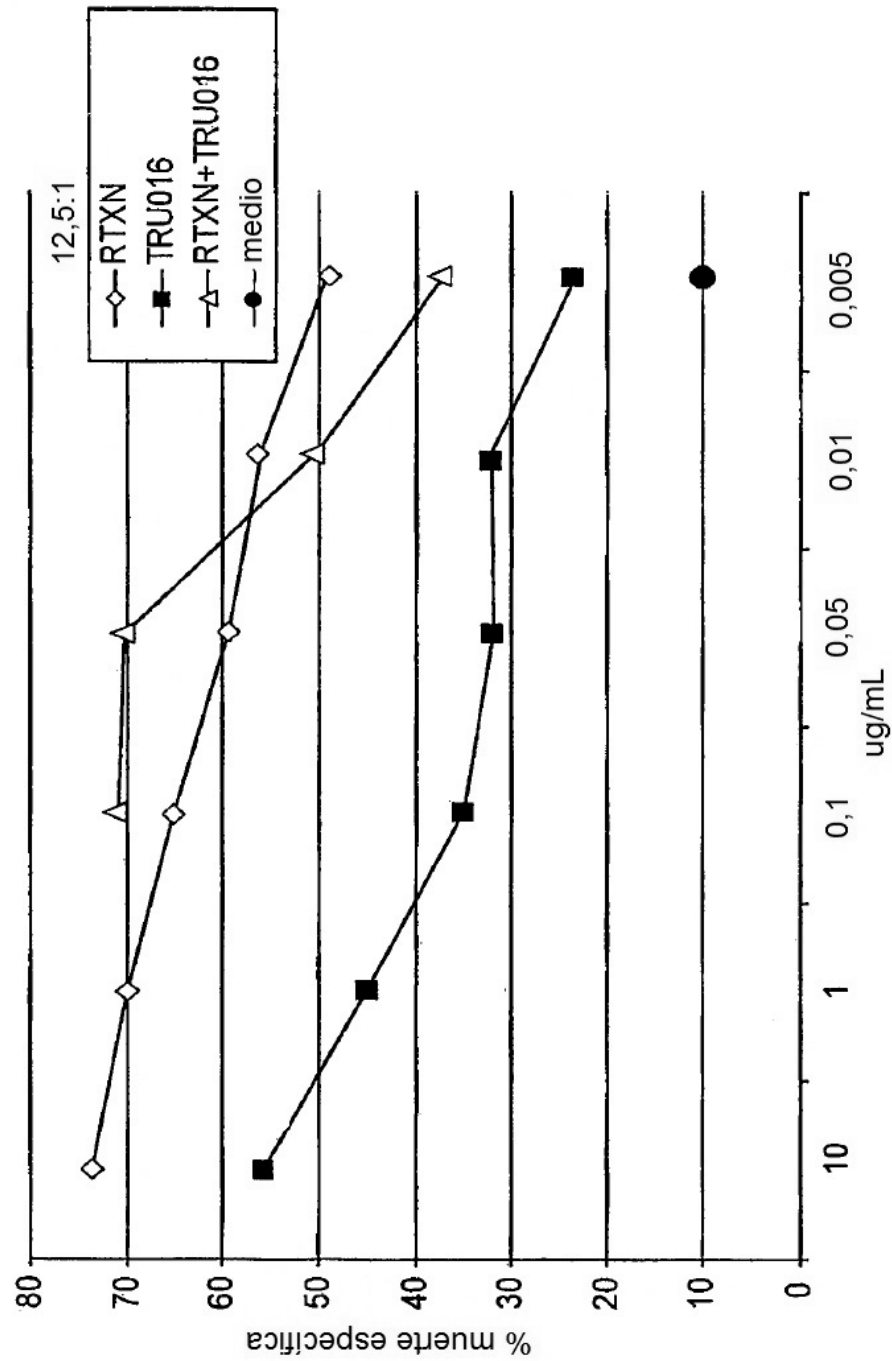


FIG. 15.

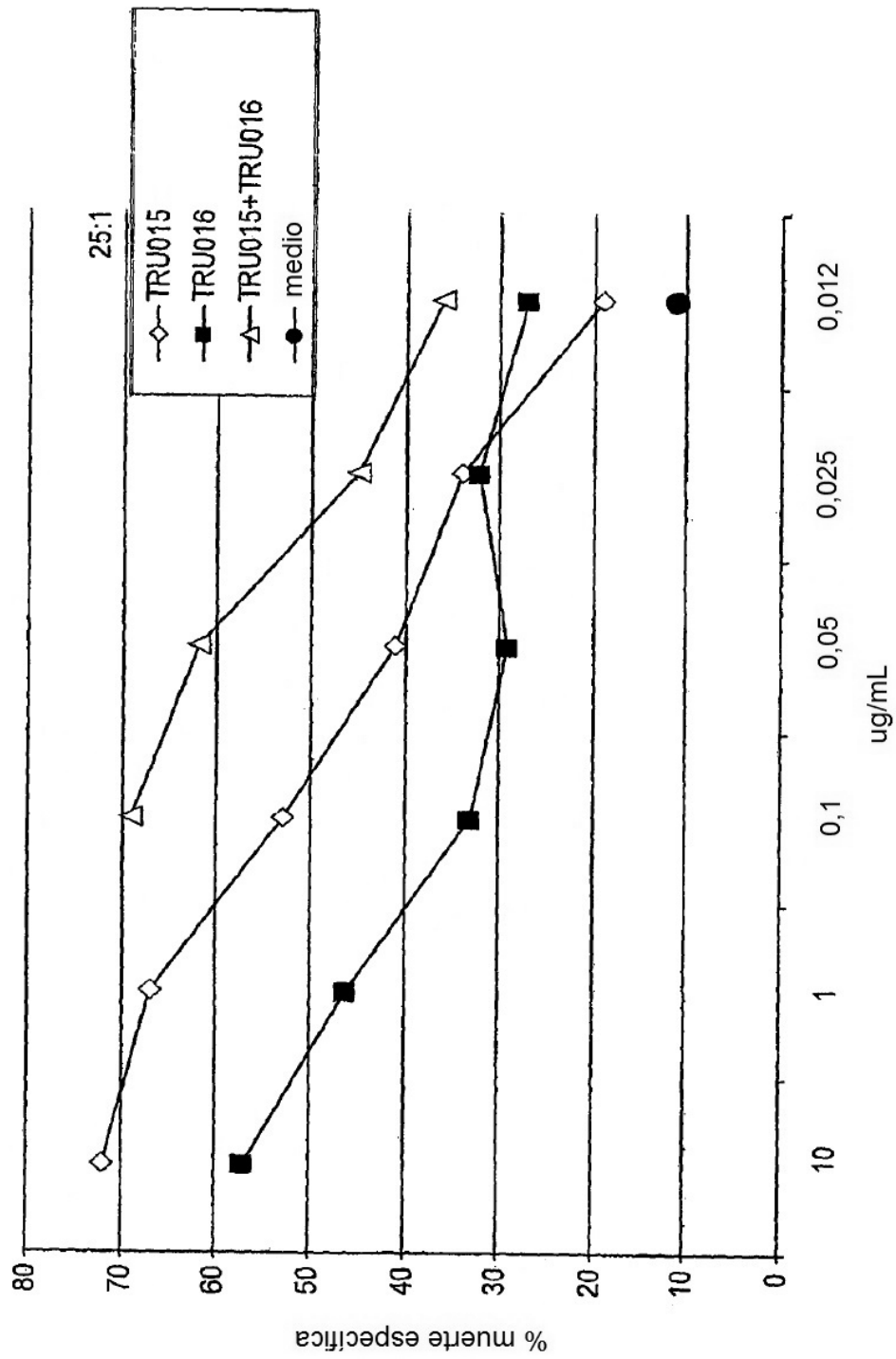


FIG. 16

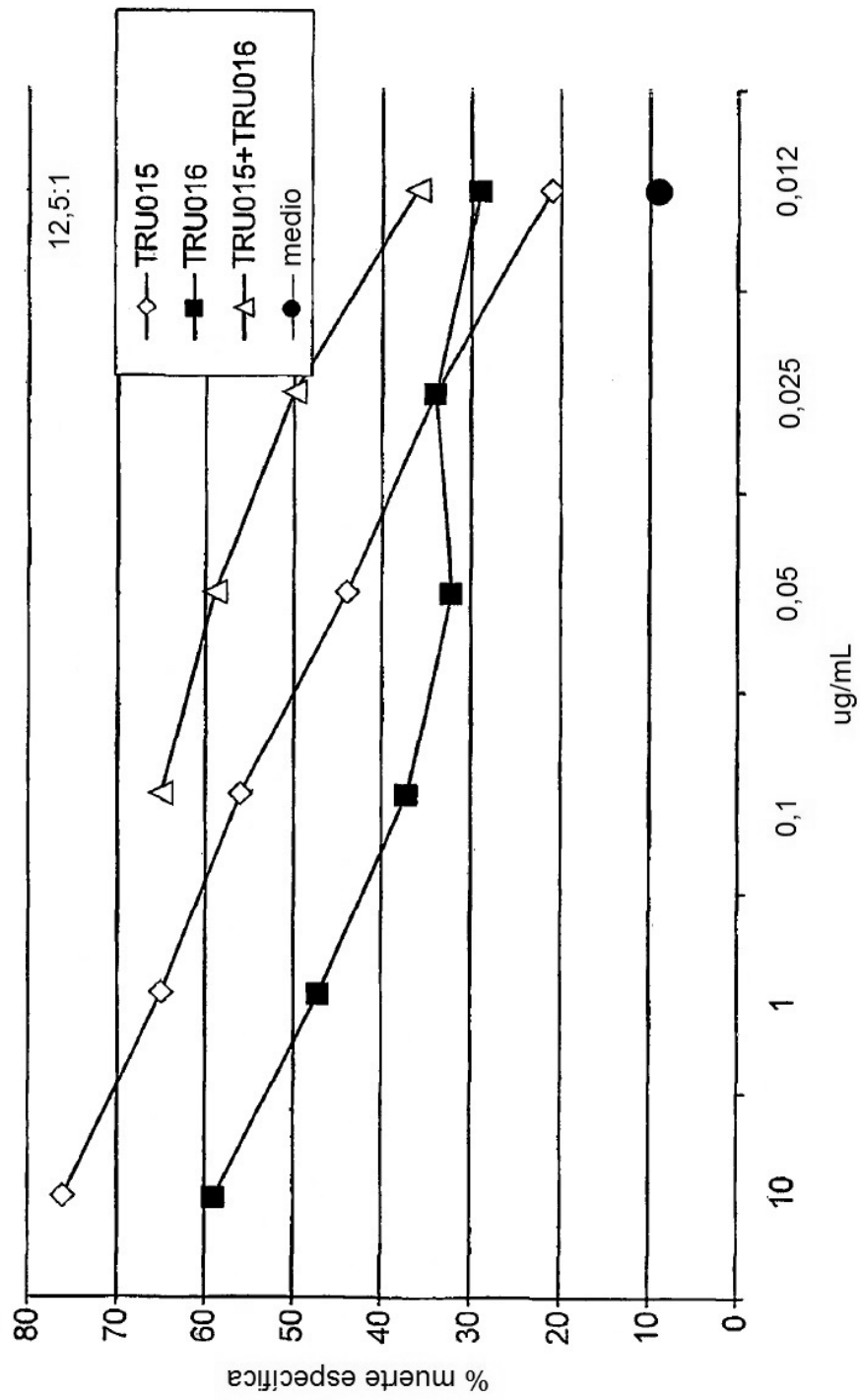


FIG. 17

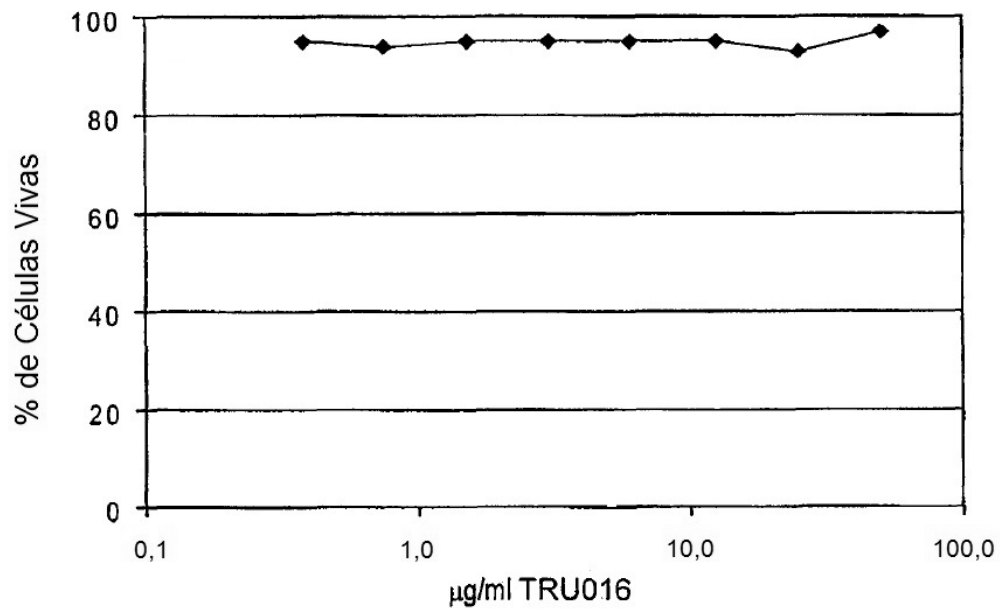


FIG. 18A

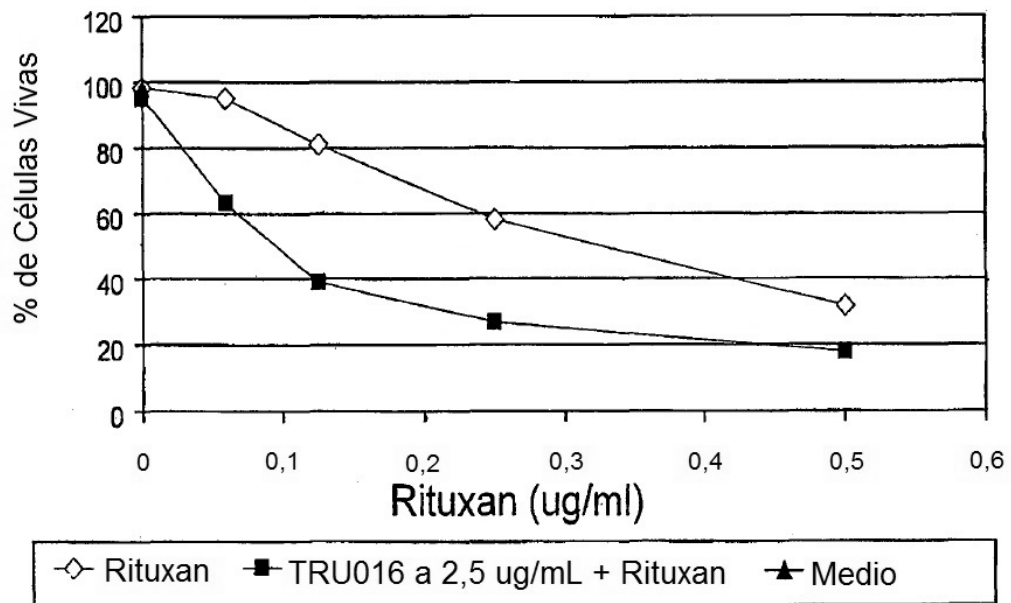


FIG. 18B

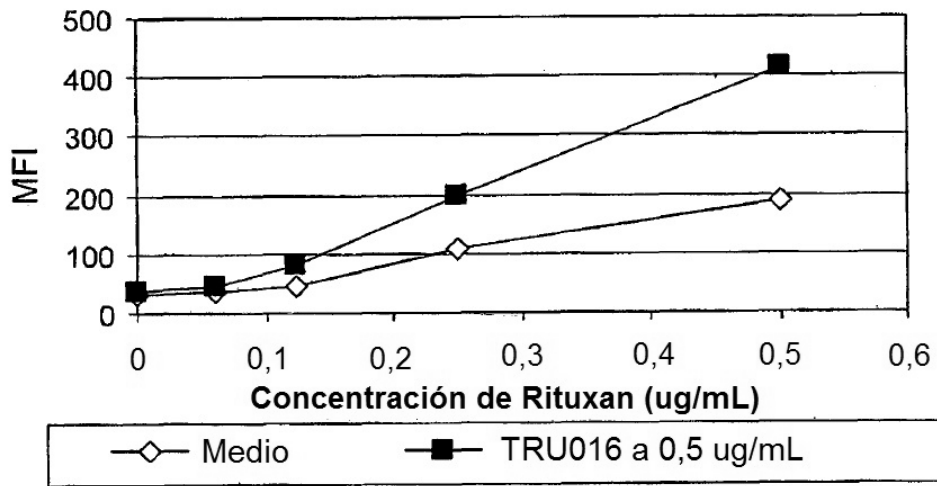


FIG. 18C

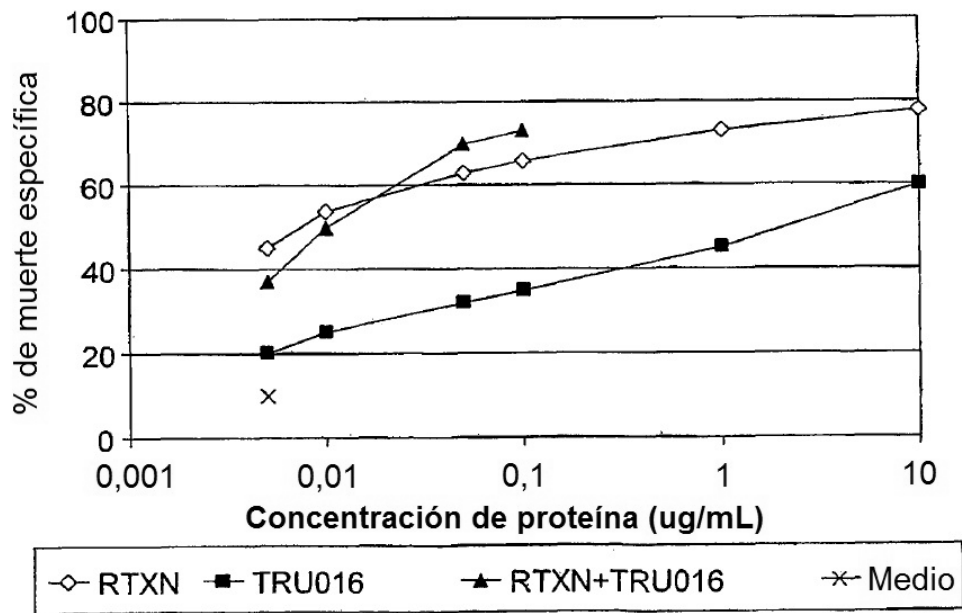


FIG. 18D

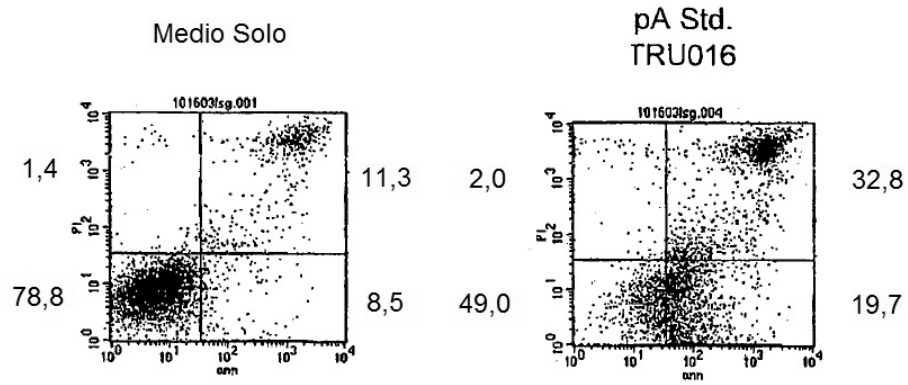


FIG. 19A

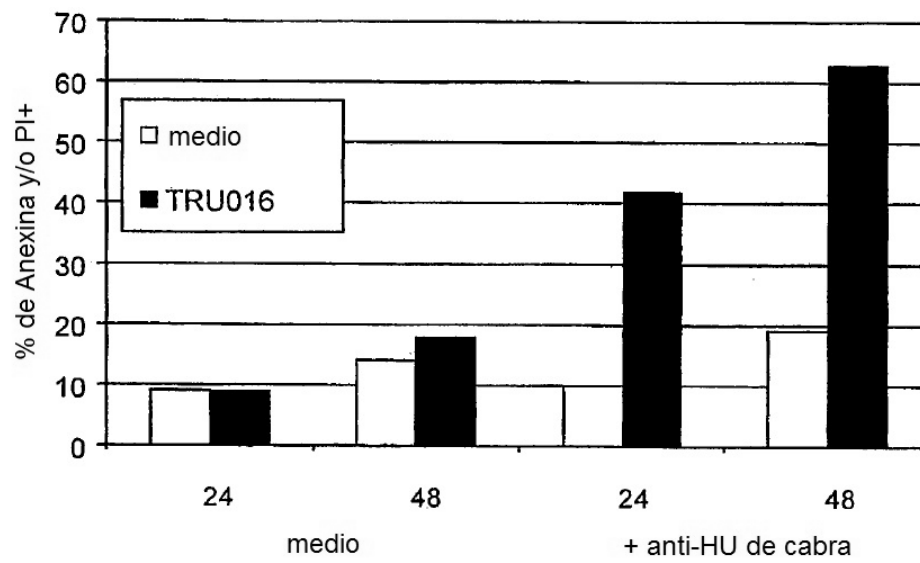


FIG. 19B

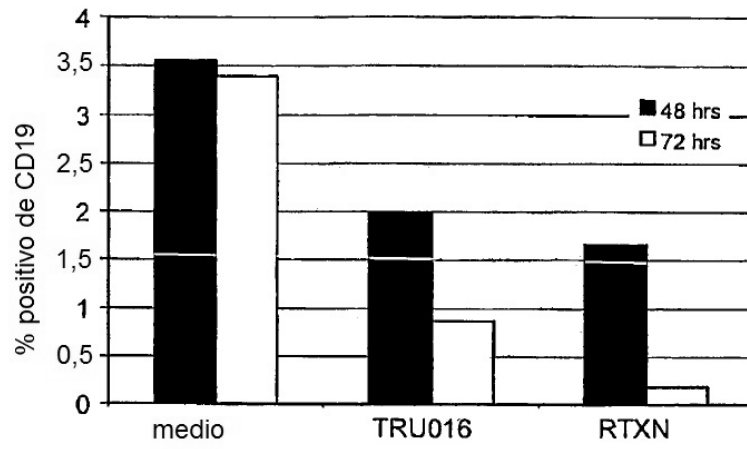


FIG. 20A

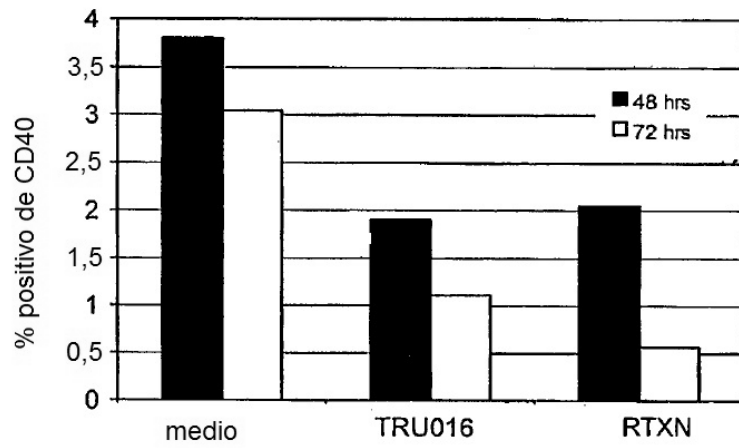


FIG. 20B

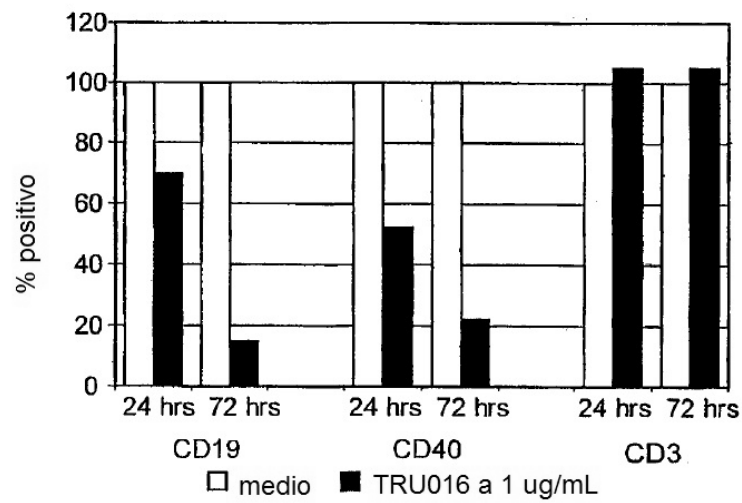


FIG. 20C

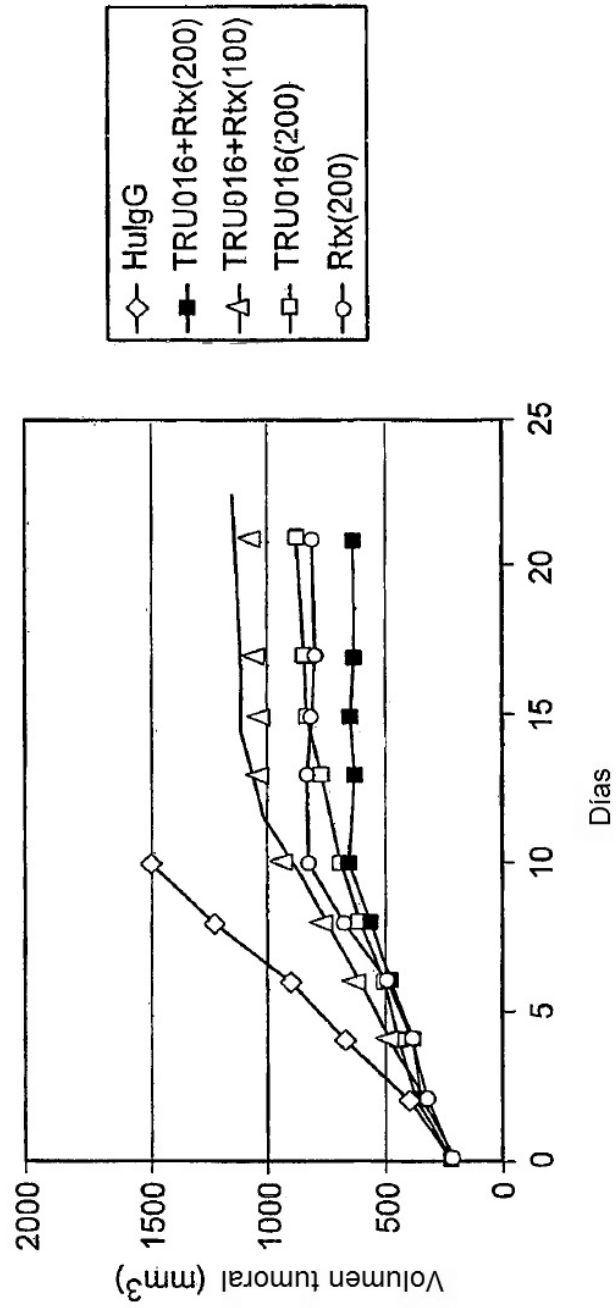


FIG. 21

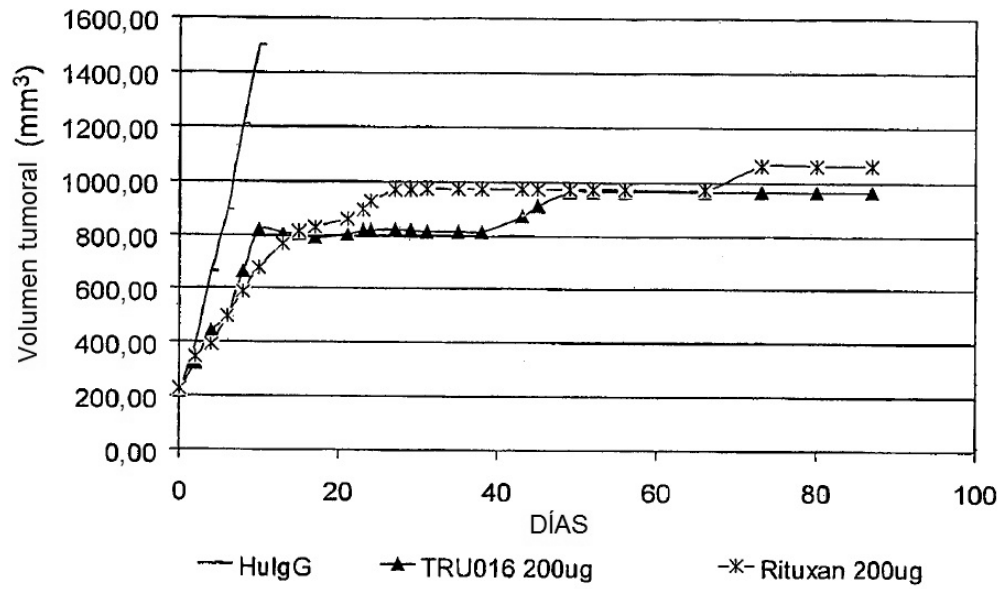


FIG. 22A

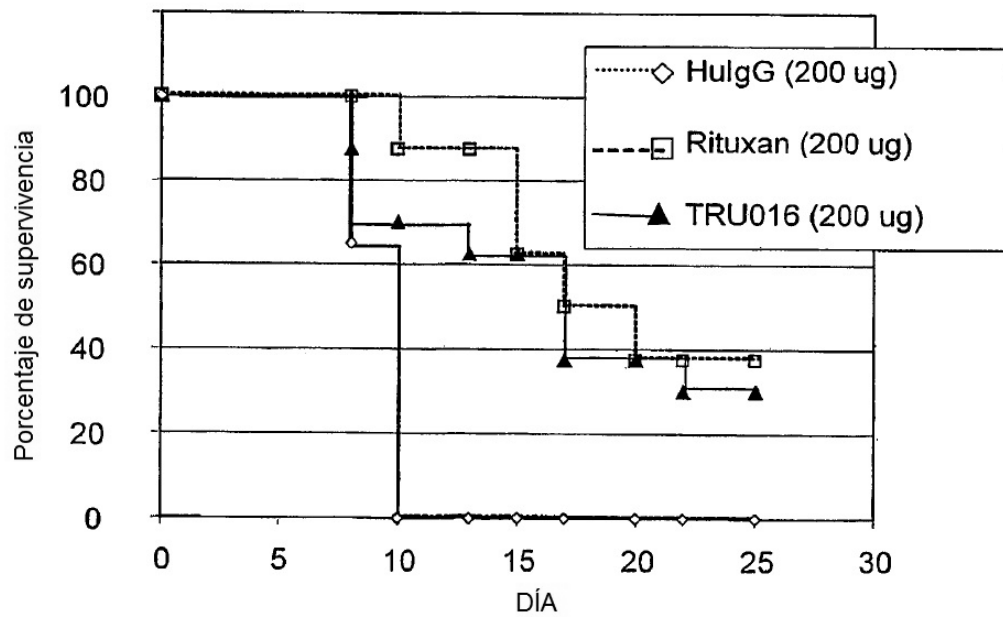


FIG. 22B

FIG. 23A

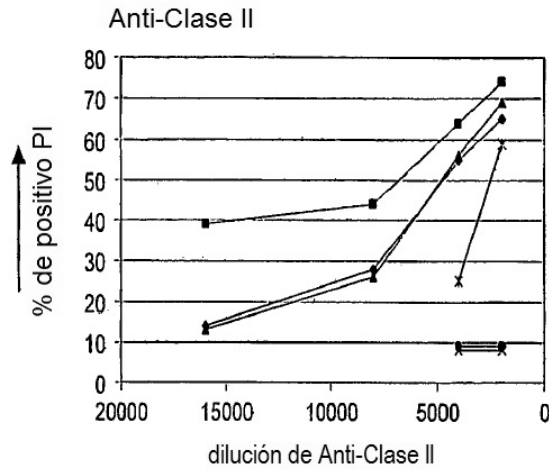
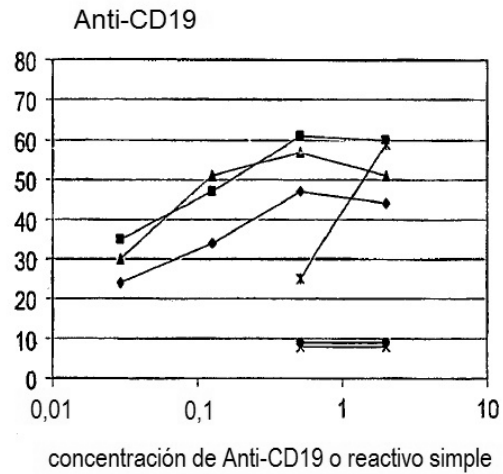
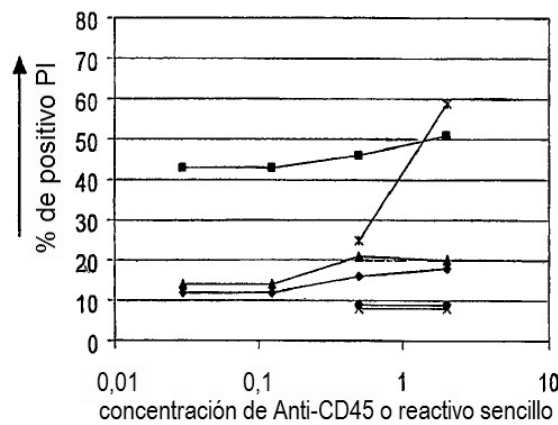


FIG. 23B



C. Anti-CD45



D. CTLA4Ig

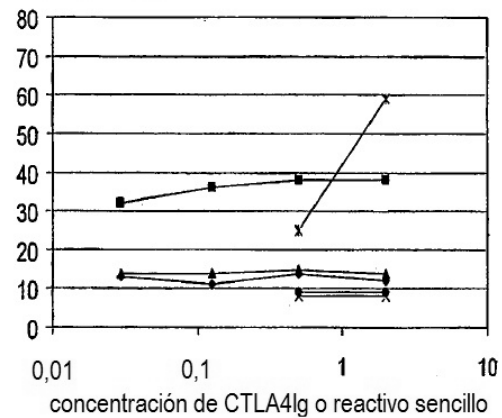


FIG. 23C

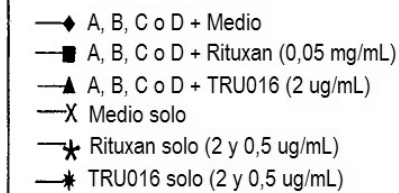


FIG. 23D

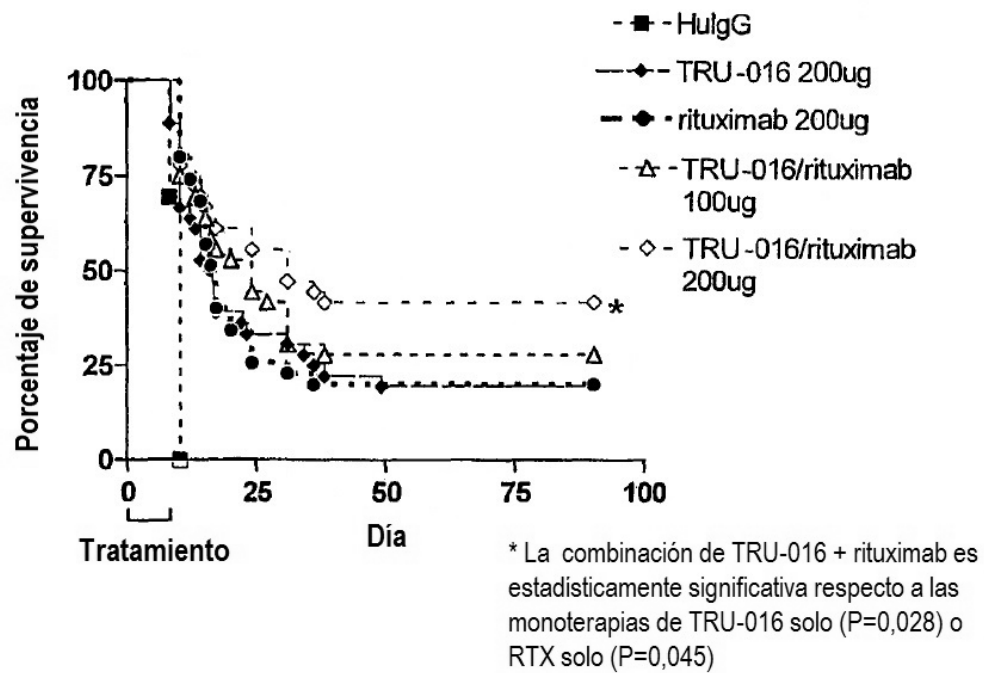


FIG. 24

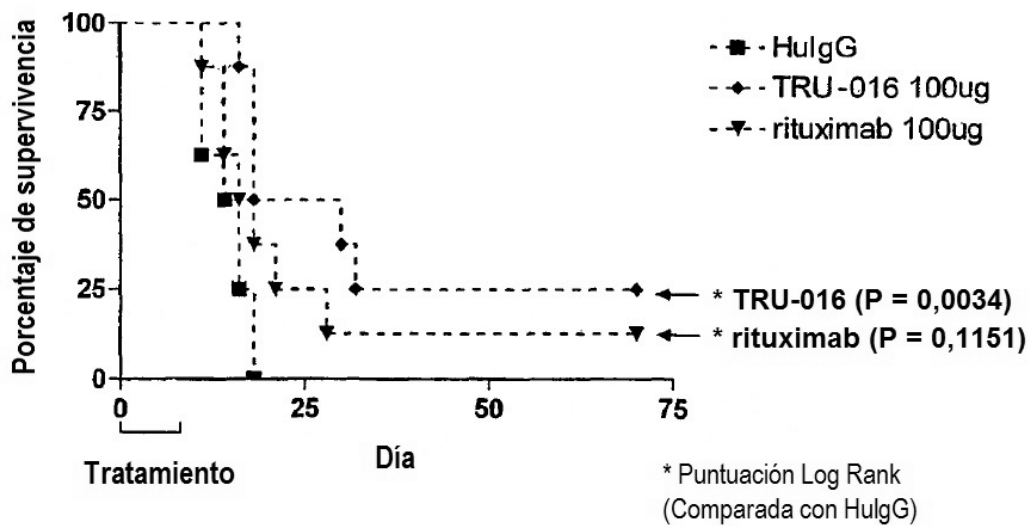


FIG. 25

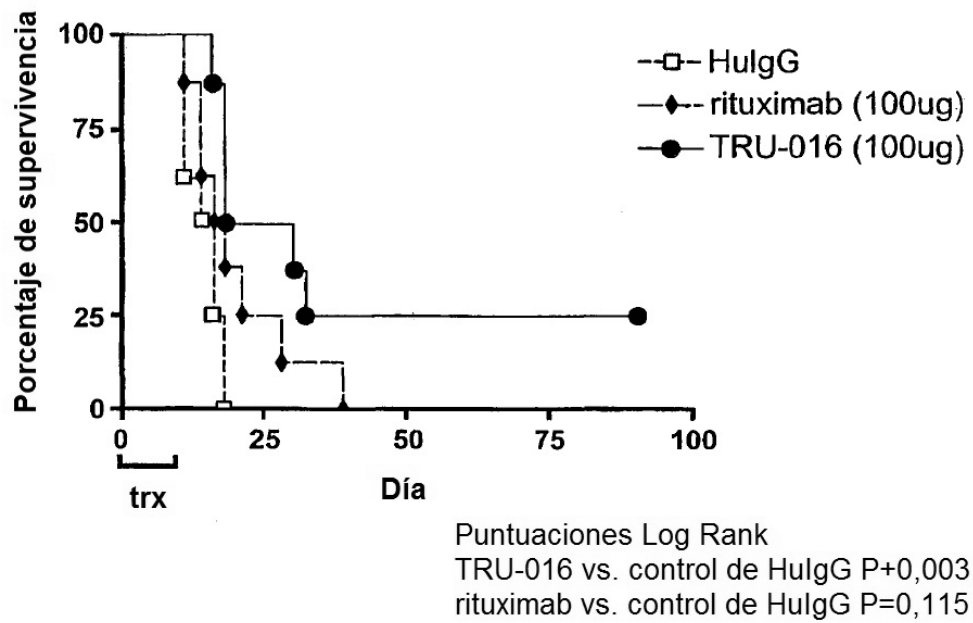


FIG. 26

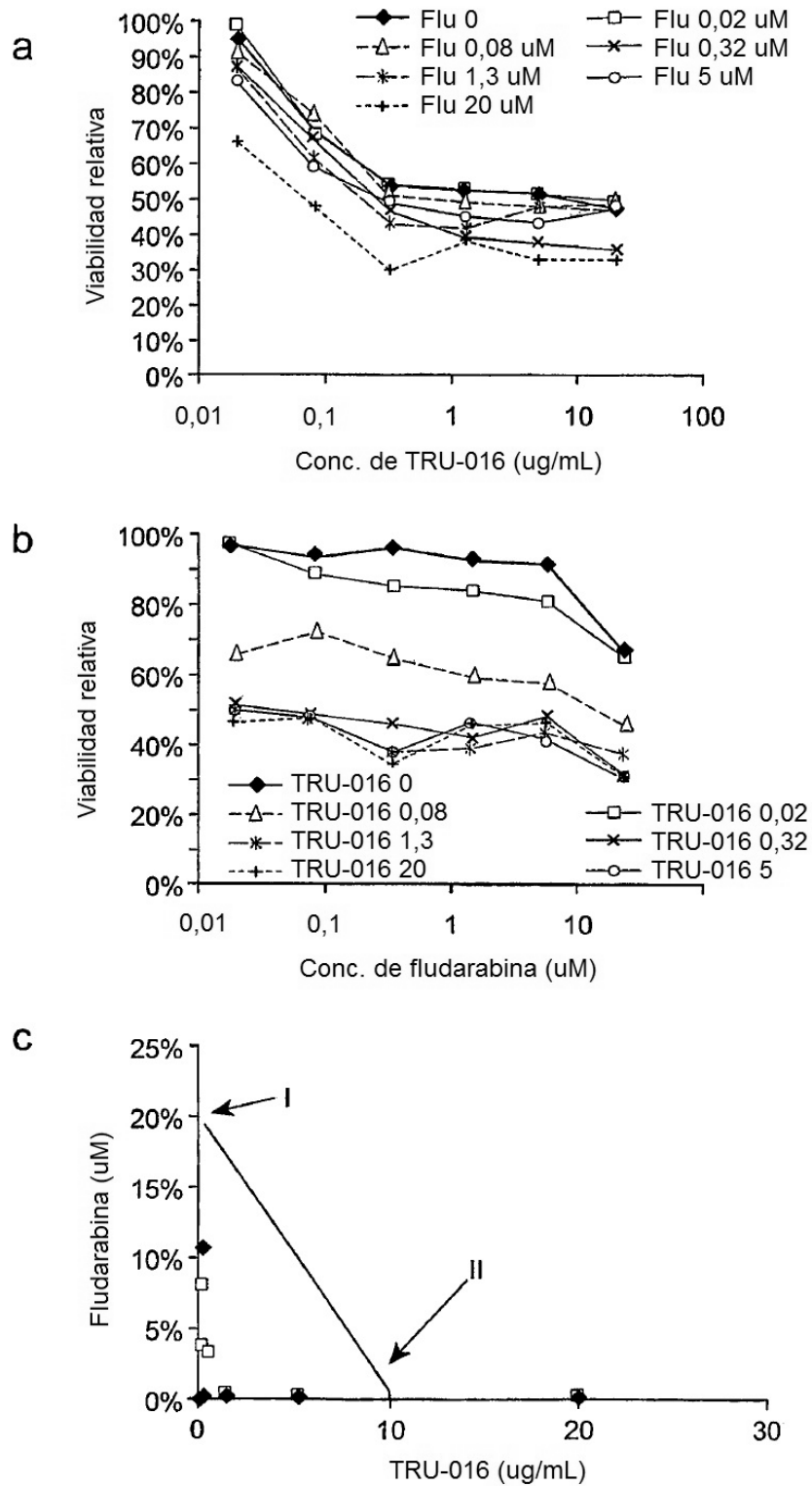
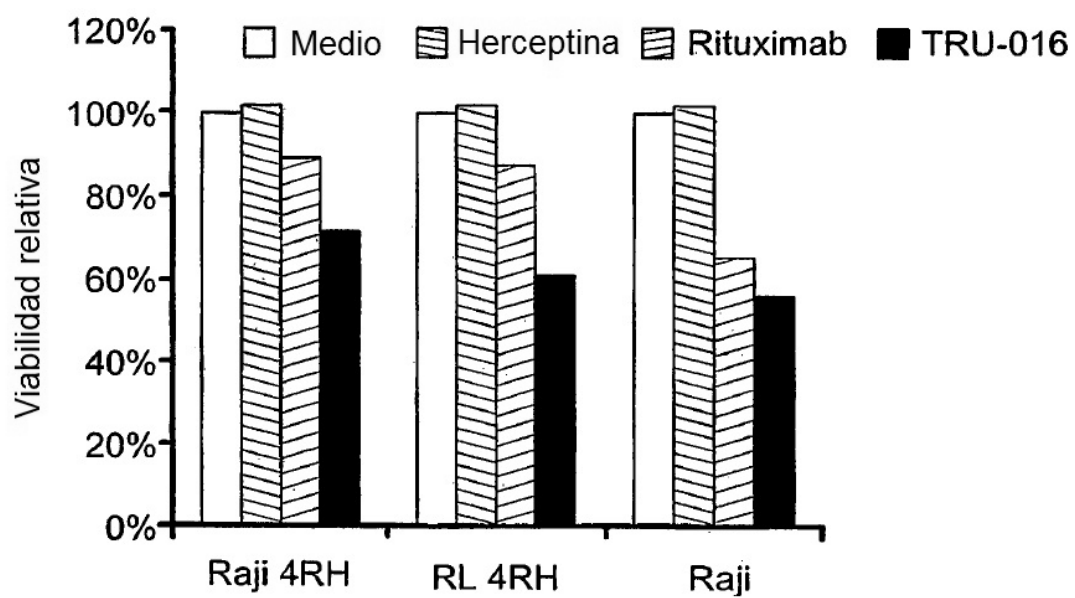


FIG. 27

**FIG. 28**

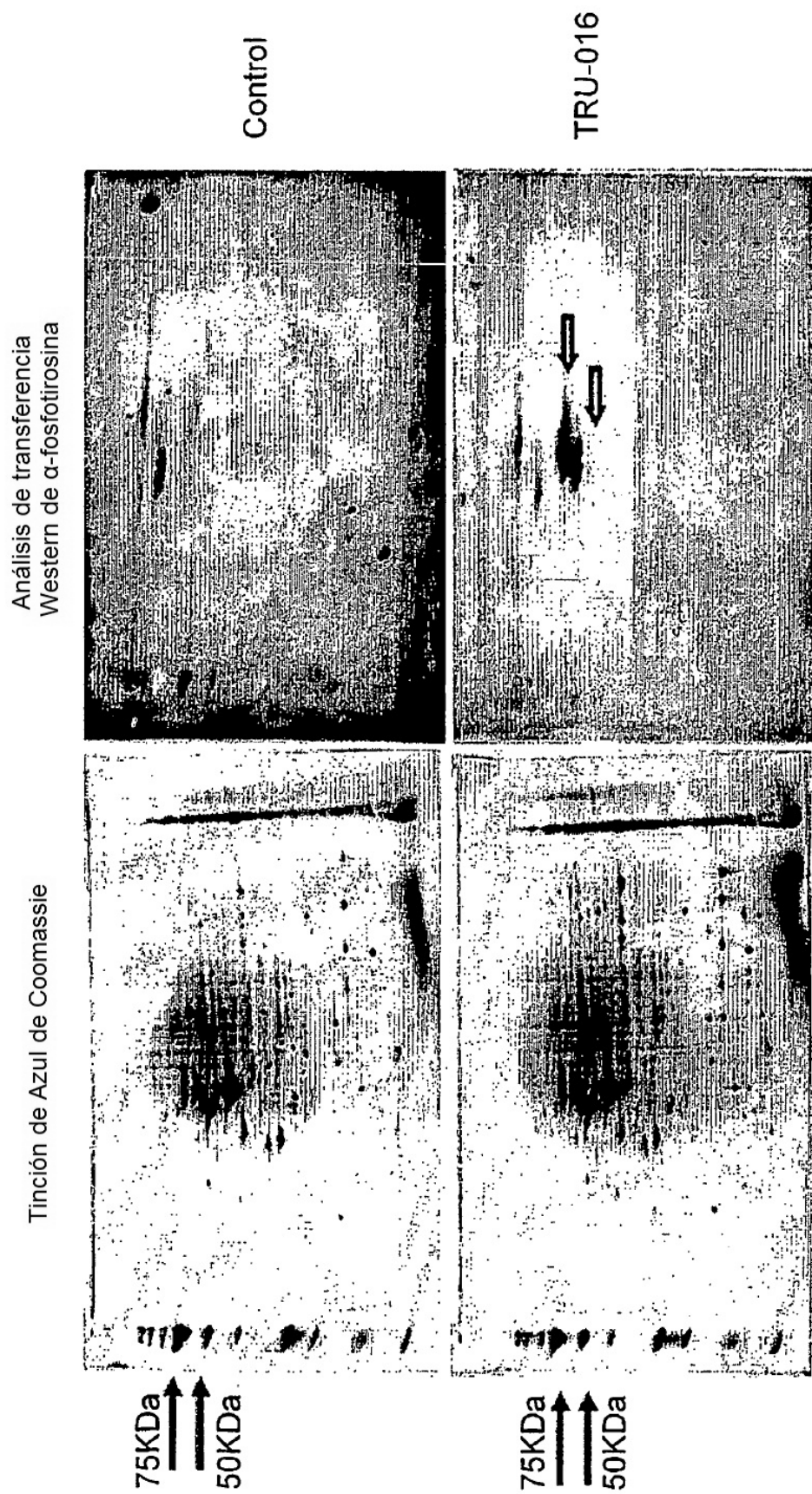


FIG. 29

		L-FR1	L-CDR1	L-FR2	
016_-_G28-1	1	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	RTSENVVSYLA	WYQKQKGKSPQLLV	49
H016_-_019001		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RTSENVVSYLA	WYQKPGQAPRLIT	
Consenso		I TQSPA LS S GE T C	RTSENVVSYLA	WYQK G P LL	
		L-CDR2	L-FR3	L-CDR3	
016_-_G28-1	50	FAKTLAE GVPSRFSGSGSGTQFSLKISSLPEDSGSYFC	QHHSNPNWT	97	
H016_-_019001		FAKTLAE GIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYC	QHHSNPNWT		
Consenso		FAKTLAE G P RFSGSGSGT F L ISSL PED	Y C QHHSNPNWT		
		L-FR4	{G4S}3 ligando	H-FR1	
016_-_G28-1	98	FGGGTELEIK GGGGSGGGSGGGGSS	AVQLQQSGPESEKPGASVKISCKASGYSFT	30	
H016_-_019001		FGQGTKVEIK GGGGSGGGSGGGGTG	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT		
Consenso		FG GT EIK GGGGSGGGSGGGG	VQL QSG E KPG S KISCK SGYSFT		
		H-CDR1	H-FR2	H-CDR2	
016_-_G28-1	31	GYNMN WVKQNGKSLEWIG	NIDPYYGGTTYNRKFKG	KATLTVDKSSS	76
H016_-_019001		GYNMN WVRQMPGKGLEWMG	NIDPYYGGTTYNRKFKG	QVTISADKSIS	
Consenso		GYNMN WY Q GK LEW G	NIDPYYGGTTYNRKFKG	T DKS S	
		H-FR3	H-CDR3	H-FR4	
016_-_G28-1	77	TAYMQLKSLTSEDSAVYYCAR	SVGPM DY WGGTSTVTSS	113	
H016_-_019001		TAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	SVGPM DY WGRGTLVTSS		
Consenso		TAY Q SL D A YYCAR	SVGPM DY WG GT VTVSS		

FIG. 30A

	1	50
H016_-_019001	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRTSENVYSYLAWYQKPGQAPRLIYF	
H016_-_019008	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRTSENVYSYLAWYQKPGQAPRLIYF	
H016_-_019009	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRTSENVYSYLAWYQKPGQAPRLIYF	
	51	100
H016_-_019001	AKTLAEGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHSDNPWTFGQ	
H016_-_019008	AKTLAEGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHSDNPWTFGQ	
H016_-_019009	AKTLAEGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHSDNPWTFGQ	
	101	150
H016_-_019001	GTKVEIKGGGSGGGGSGGGGTGEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGY	
H016_-_019008	GTKVEIKGGGSGGGGSGGGGASEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGY	
H016_-_019009	GTKVEIKGGGSGGGGSGGGGASEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGY	
		** *
	151	200
H016_-_019001	SFTGYNMNWRQMPGKGLEWMGNIDPYGGTTYNRKFKGQVTISADKSI	
H016_-_019008	SFTGYNMNWRQMPGKGLEWMGNIDPYGGTTYNRKFKGQVTISADKSI	
H016_-_019009	SFTGYNMNWRQMPGKGLEWMGNIDPYGGTTYNRKFKGHVTISADKSI	
		*
	201	239
H016_-_019001	TAYLQWSSSLKASDTAMYVCARSVGPMDYWGRGTLVTVSS	
H016_-_019008	TAYLQWSSSLKASDTAMYVCARSVGPMDYWGRGTLVTVSS	
H016_-_019009	TAYLQWSSSLKASDTAMYVCARSVGPMDYWGRGTLVTVSS	

FIG. 30B

ID de Construcción	Descripción	Bisagra	Secuencia de ADN
019001	Vk3:VH5-51	SSC-P	atggaagccccagctcagcttctctctctctctactctggtccag
019041	Vk3:VH5-51	SSC-P	aagcttgcgccttggaagccccagcagcttctctctctcigcta
019044	Vk3:VH5-51	SSC-P	aagcttgcgccttggaagccccagcagcttctctctctcigcta

Secuencia de aminoácidos

meapaqlfllllwlpdttgeivltqspatlsipgeratiscrtsenvyslawyqqkpgqaprlilyfaklaegiparfsgsgsgtdftitisslepedfavyyqcqhhsdnppwffgqgkveikggsgsgsgsgsggtgve

meapaqlfllllwlpdttgeivltqspatlsipgeratiscrtsenvyslawyqqkpgqaprlilyfaklaegiparfsgsgsgtdftitisslepedfavyyqcqhhsdnppwffgqgkveikggsgsgsgsgsggtgve

meapaqlfllllwlpdttgeivltqspatlsipgeratiscrtsenvyslawyqqkpgqaprlilyfaklaegiparfsgsgsgtdftitisslepedfavyyqcqhhsdnppwffgqgkveikggsgsgsgsgsggtgve

rlvlvsgaevkpkgeslkiscgsgysftgynmnwvrqmpgkglewmgnidpyvggtitnrklkgqvtsadksistaylqwsllkasdtamyycarsvpgmdywggrlvtvssdqepkssdkthtispccpap

vlvlvsgaevkpkgeslkiscgsgysftgynmnwvrqmpgkglewmgnidpyvggtitnrklkgqvtsadksistaylqwsllkasdtamyycarsvpgfdywgqglvtvssdqepkssdkthtispccpap

vlvlvsgaevkpkgeslkiscgsgysftgynmnwvrqmpgkglewmgnidpyvggtitnrklkgqvtsadksistaylqwsllkasdtamyycarsvpgfdswgqglvtvssdqepkssdkthtispccpap

elggpsvfflppkpkdltmistrpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktipreeqynstyrvvsvltlhqdwlngkeykckvsnkalpapietkiskakgqprepqvyltppsrdeitknqvslctlvkgfy

elggpsvfflppkpkdltmistrpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktipreeqynstyrvvsvltlhqdwlngkeykckvsnkalpapietkiskakgqprepqvyltppsrdeitknqvslctlvkgfy

elggpsvfflppkpkdltmistrpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktipreeqynstyrvvsvltlhqdwlngkeykckvsnkalpapietkiskakgqprepqvyltppsrdeitknqvslctlvkgfy

rpdsiavewesngapennnykttppvldsdgsfflyskltvdksnrwqqgnvfscsvmhealnhlytqkslsispkg

rpdsiavewesngapennnykttppvldsdgsfflyskltvdksnrwqqgnvfscsvmhealnhlytqkslsispkg*

rpdsiavewesngapennnykttppvldsdgsfflyskltvdksnrwqqgnvfscsvmhealnhlytqkslsispkg*

FIG. 31

FIG. 32A

```

CADENA LIGERA      .....FR1.....   _CDR1_   .....FR2.....
019041      EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC  RASENVYSYLA  WYQQKPGQAPRLLIY
019044      EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC  RASENVYSYLA  WYQQKPGQAPRLLIY
019001      EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC  RTSENVYSYLA  WYQQKPGQAPRLLIY

                _CDR2_   .....FR3.....   _CDR3_   ....FR4...
019041      FAKTLAE  GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC  QHHSNPNWT  FGQGTKVEIK
019044      FAKTLAE  GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC  QHHSNPNWT  FGQGTKVEIK
019001      FAKTLAE  GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC  QHHSNPNWT  FGQGTKVEIK

CADENA PESADA      .....FR1.....   CDR1   .....FR2.....
019041      EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT  GYNMN  WVRQMPGKGLEWMG
019044      EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT  GYNMN  WVRQMPGKGLEWMG
019001      EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT  GYNMN  WVRQMPGKGLEWMG

                _CDR2_   .....FR3.....
019041      NIDPYYGGTTYNRKFKG  QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
019044      NIDPYYGGTTYNRKFKG  QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
019001      NIDPYYGGTTYNRKFKG  QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR

                _CDR3_   ....FR4...
019041      SVGPFDY  WQGTLTVTVSS
019044      SVGPFDS  WQGTLTVTVSS
019001      SVGPMYD  WGRGTLTVTVSS

CLUSTAL W (1,83) alineamiento de secuencia múltiple

019041      -----ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCA  48
019044      -----ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCA  48
019001      AAGCTTGCCGCCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCA  60

```



FIG. 32B



```

*****
019041      GATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGC 108
019044      GATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGC 108
019001      GATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGC 120
*****

019041      GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCCGAGCAAGTGAAAATGTTTACAGCTACTTAGCCTGGTAC 168
019044      GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCCGAGCAAGTGAAAATGTTTACAGCTACTTAGCCTGGTAC 168
019001      GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCCGAGCAAGTGAAAATGTTTACAGCTACTTAGCCTGGTAC 180
*****

019041      CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCTAGGCTCCTCATCTATTTGCAAAAACCTTAGCAGAA 228
019044      CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCTAGGCTCCTCATCTATTTGCAAAAACCTTAGCAGAA 228
019001      CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCTAGGCTCCTCATCTATTTGCAAAAACCTTAGCAGAA 240
*****

019041      GGAATTCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC 288
019044      GGAATTCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC 288
019001      GGAATTCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC 300
*****

019041      AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACATCATTCGATAATCCGTGG 348
019044      AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACATCATTCGATAATCCGTGG 348
019001      AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACATCATTCGATAATCCGTGG 360
*****

019041      ACATTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAGGTGGCGGCGGCTCGGGCGGTGGTGGA 408
019044      ACATTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAGGTGGCGGCGGCTCGGGCGGTGGTGGA 408
019001      ACATTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAGGTGGCGGCGGCTCGGGCGGTGGTGGA 420
*****

019041      TCTGGAGGAGGTGGGACCGGTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAG 468
019044      TCTGGAGGAGGTGGGACCGGTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAG 468
019001      TCTGGAGGAGGTGGGACCGGTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAG 480
*****

019041      CCCGGAGAGTCTCTGAAGATTTCTGTAAAGGGATCCGGTTACTCATTCACTGGCTACAAT 528
019044      CCCGGAGAGTCTCTGAAGATTTCTGTAAAGGGATCCGGTTACTCATTCACTGGCTACAAT 528
019001      CCCGGAGAGTCTCTGAAGATTTCTGTAAAGGGATCCGGTTACTCATTCACTGGCTACAAT 540
*****

019041      ATGAACTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCCTCGAGTGGATGGGCAATATTGATCCT 588
019044      ATGAACTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCCTCGAGTGGATGGGCAATATTGATCCT 588
019001      ATGAACTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCCTCGAGTGGATGGGCAATATTGATCCT 600
*****

019041      TATTATGGTGGTACTACCTACAACCGGAAGTTCAAGGGCCAGGTCACTATCTCCGCCGAC 648

```



FIG. 32C

```

019044      TATTATGGTGGTACTACCTACAACCGGAAGTTCAAGGGCCAGGTCACTATCTCCGCCGAC 648
019001      TATTATGGTGGTACTACCTACAACCGGAAGTTCAAGGGCCAGGTCACTATCTCCGCCGAC 660
            *****

019041      AAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAATGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATG 708
019044      AAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAATGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATG 708
019001      AAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAATGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATG 720
            *****

019041      TATTACTGTGCACGCTCAGTCGGGCCCTTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACT 768
019044      TATTACTGTGCACGCTCAGTCGGGCCCTTTCGACTCTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACT 768
019001      TATTACTGTGCACGCTCAGTCGGGCCCTATGGACTACTGGGGCCCGGGCACCCCTGGTCACT 780
            ***** * *****

019041      GTCTCCTCTGATCAGGAGCCCAAACTCTTCTGACAAAACCTCACACATCTCCACCGTGCCCA 828
019044      GTCTCCTCTGATCAGGAGCCCAAACTCTTCTGACAAAACCTCACACATCTCCACCGTGCCCA 828
019001      GTCTCCTCTGATCAGGAGCCCAAACTCTTCTGACAAAACCTCACACATCTCCACCGTGCCCA 840
            *****

019041      GCACCTGAACTCTGGGTGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACC 888
019044      GCACCTGAACTCTGGGTGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACC 888
019001      GCACCTGAACTCTGGGTGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACC 900
            *****

019041      CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC 948
019044      CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC 948
019001      CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC 960
            *****

019041      CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG 1008
019044      CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG 1008
019001      CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG 1020
            *****

019041      CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCAC 1068
019044      CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCAC 1068
019001      CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCAC 1080
            *****

019041      CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC 1128
019044      CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC 1128
019001      CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC 1140
            *****

019041      CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACC 1188
019044      CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACC 1188
019001      CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACC 1200
            *****

```





```

019041 CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA 1248
019044 CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA 1248
019001 CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA 1260
*****

019041 GGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC 1308
019044 GGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC 1308
019001 GGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC 1320
*****

019041 TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC 1368
019044 TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC 1368
019001 TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC 1380
*****

019041 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG 1428
019044 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG 1428
019001 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG 1440
*****

019041 GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA----- 1482
019044 GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA----- 1482
019001 GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATCTAGA 1500
*****

```

FIG. 32D