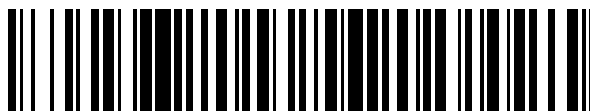


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 202**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2008 E 08787055 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2178915**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD37**

30 Prioridad:

09.08.2007 EP 07114128

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.12.2015

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (100.0%)
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**HEIDER, KARL-HEINZ;
BORGES, ERIC y
OSTERMANN, ELINBORG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 555 202 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos Anti-CD37

Introducción

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

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

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

CD37, un miembro de la superfamilia de la tetraspanina, es una molécula de la superficie celular altamente glicosilada con cuatro dominios transmembrana y dos bucles extracelulares. CD37 se expresa casi exclusivamente en las células B maduras, con los niveles de expresión más altos en las células B de la sangre periférica, niveles reducidos en las células plasmáticas y niveles no detectables en las células B precursoras CD10+ en la médula ósea. También se ha mostrado un nivel bajo de expresión de CD37 en células T sin activar y activadas, granulocitos y monocitos. En los neoplasmas de células B, la expresión de CD37 se observa principalmente en el linfoma no-Hodgkin agresivo (NHL) y en leucemia linfocítica crónica (CLL). También se ha encontrado un nivel alto de expresión de CD37 en el linfoma de células del manto (MCL). Este patrón de expresión hace a CD37 una diana atractiva para una terapia de cáncer mediada por anticuerpos.

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

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

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

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

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

El mAb anti-CD37 MB-1 se evaluó en dos ensayos de radio-inmunoterapia en pacientes con B-NHL (linfoma de células B no-Hodgkin; Press et al., 1989; Kaminski et al., 1992). Se administraron dosis terapéuticas de ¹³¹I-MB-1 a 6 pacientes con recaída de NHL en un ensayo y los 6 pacientes consiguieron una remisión clínica completa (CR) con una duración media de 7 meses. Es importante que dos de los seis pacientes mostraron regresiones clínicas después de la administración de sólo la dosis trazadora de MB-1 lo que sugiere un efecto antitumoral directo del

anticuerpo en sí mismo. En el segundo ensayo, se aplicó MB-1 marcado radiactivamente para el tratamiento de pacientes refractarios con NHL y resultó que en 3 de 9 pacientes evaluables se obtuvieron respuestas objetivas de duración limitada (Kaminski et al., 1992). En ambos ensayos, se mostró una supresión rápida y transitoria de células B periféricas después de la inyección de la dosis trazadora de anticuerpo MB-1 marcado. Estas observaciones apoyan la conclusión de que MB-1 ejerce una actividad citotóxica por sí mismo. En resumen, estos ensayos clínicos recalcan la factibilidad de la utilización de CD37 como diana para las malignidades de las células B y apuntan a una relevancia clínica potencial de la terapia anti-CD37.

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

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

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

El documento WO 2005/017148 da a conocer un anticuerpo monoclonal murino anti-CD37 designado G28.1

Boulianne et al (1984) Nature vol. 312, nº 5995, págs 643-646 se refiere a técnicas para la producción de anticuerpos de ratón-humano quiméricos.

El documento US 6,548,640 da a conocer técnicas para la preparación de derivados humanizados de anticuerpos monoclonales de ratón.

El documento WO 2007/041635 da a conocer técnicas para alterar la región Fc de los anticuerpos a fin de obtener propiedades modificadas en la modulación de la función efectora.

El documento WO 2007/014278 da a conocer el uso de anticuerpos anti-CD37, a solas o en combinación con anticuerpos anti-CD20, para el tratamiento de neoplasias de células B.

Sumario de la invención

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

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

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

Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo quimérico que se une a CD37 humano y que está definido por:

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

La molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo quimérica obtenida a partir del anticuerpo de partida designado G28.1 y descrito en WO 2005/017148.

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

La construcción y producción de anticuerpos quiméricos ratón/humano es muy conocida en la técnica (Boulianne et al., 1984). Las regiones variables del anticuerpo no humano se unen típicamente a al menos una parte (F_C) de la región constante de la inmunoglobulina de una inmunoglobulina humana. Las secuencias de ADN de la región constante humana se pueden aislar según procedimientos muy conocidos a partir de varias células humanas, preferiblemente a partir de células B inmortalizadas (véanse Kabat et al., 1991; y WO 87/02671). Las moléculas de anticuerpo pueden contener toda o una parte de la región constante siempre que exhiban una unión específica al antígeno CD37 y a los receptores F_C . La elección del tipo y longitud de la región constante depende de si se desean funciones efectoras como fijación de complemento o toxicidad celular mediada por células dependiente de anticuerpo y de las propiedades farmacológicas deseadas de la molécula de anticuerpo.

En determinadas realizaciones, la molécula de anticuerpo de la invención como se define en las reivindicaciones es un anticuerpo específico de CD37 quimérico que tiene la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo no humano definido en las reivindicaciones fusionada con la región constante de la cadena pesada IgG1 humana y la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo no humano definido en las reivindicaciones fusionada con la región constante de la cadena ligera kappa humana.

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

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

En una descripción adicional de la invención, la molécula de anticuerpo anti-CD37 es un anticuerpo humanizado que está definido por

- i. CDR contenidas en la cadena pesada variable como se muestra en SEQ ID NO:2 y por
- ii. CDR contenidas en la cadena ligera variable como se muestra en SEQ ID NO:4,
- iii. marcos que soportan dichas CDR que se obtienen a partir de un anticuerpo humano,
- iv. cadenas pesadas y ligeras constantes que son de un anticuerpo humano.

Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, anticuerpos murinos, de rata o conejo) son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de éstas (tales como F_v , Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras moléculas de unión a antígenos con subsecuencias de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas obtenidas a partir de inmunoglobulinas no humanas.

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

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

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

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

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

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

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

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

25 Una descripción adicional se refiere a anticuerpos humanizados que tienen una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:10 y una cadena ligera variable con una secuencia seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22.

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

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

35 En determinadas realizaciones, en los anticuerpos humanizados de la descripción, la cadena pesada constante humana IgG1 es una molécula de IgG1 con la secuencia mostrada en SEQ ID NO:24 o una molécula de IgG1 mutada obtenida de ésta y la región constante de la cadena ligera kappa humana que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:26.

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

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

55 En comparación con un anticuerpo definido por sus cadenas variables mostradas en el listado de secuencias, las variantes de anticuerpo tienen una identidad de secuencia en las regiones CDR de al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% ó 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos

95%. Los anticuerpos preferidos también tienen una similitud de secuencia en las regiones CDR de al menos 80%, más preferiblemente 90% y lo más preferiblemente 95%. Las variantes preferidas de anticuerpos tienen una identidad de secuencia en las regiones variables de al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% u 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%. Los anticuerpos preferidos también

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

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

10 También puede obtenerse una variante usando un anticuerpo con una secuencia definida como se muestra en el listado de secuencias como punto de partida para optimizar y diversificar uno o más restos de aminoácidos, preferiblemente restos de aminoácidos en una o más CDR y cribando la colección resultante de variantes de anticuerpos con respecto a variantes con propiedades mejoradas. Se ha demostrado que es útil la diversificación de uno o más restos de aminoácidos en la CDR3 de la cadena ligera variable, CDR3 de la cadena pesada variable,

15 CDR1 de la cadena ligera variable y/o CDR2 de la cadena pesada variable. La diversificación puede hacerse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, la tecnología denominada TRIM a la que se hace referencia en WO 2007/042309.

En una descripción adicional, la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención como se define en las reivindicaciones es un anticuerpo de "afinidad madurada".

20 Un anticuerpo anti-CD37 de "afinidad madurada" es un anticuerpo anti-CD37 obtenido a partir de un anticuerpo con las secuencias mostradas en el listado de secuencias, que tiene una o más alteraciones en una o más CDR que resultan en una mejora de la afinidad para los antígenos comparada con el anticuerpo no madurado original respectivo. Uno de los procedimientos para generar dichos anticuerpos mutantes implica la expresión en fagos (Hawkins et al., 1992; y Lowman et al., 1991). Brevemente, se mutan varios sitios de regiones hipervariables (por

25 ejemplo 6-7 sitios) para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos mutantes así generados se expresan de una manera monovalente en partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetados dentro de cada partícula. Los mutantes expresados por los fagos se criban entonces respecto a su actividad biológica (por ejemplo, la afinidad de unión) como se describe en la presente memoria.

30 Los anticuerpos de afinidad madurada también pueden producirse por métodos como describen, por ejemplo, Marks et al., 1992, (maduración de la afinidad barajando dominios de cadena pesada variables (VH) y cadena ligera variables (VL)) o Barbas et al., 1994; Shier et al., 1995; Yelton et al., 1995; Jackson et al., 1995; y Hawkins et al., 1992 (mutagénesis aleatoria de restos CDR y/o marco). Los anticuerpos preferidos de afinidad madurada tendrán afinidades del orden nanomolar o incluso picomolar por el antígeno diana. En una realización adicional, la molécula

35 de anticuerpo anti-CD37 de la invención como se define en las reivindicaciones es un anticuerpo "desinmunizado".

Un anticuerpo anti-CD37 "desinmunizado" es un anticuerpo obtenido a partir de un anticuerpo humanizado o quimérico con una secuencia mostrada en el listado de secuencias, que tiene una o más alteraciones en su secuencia de aminoácidos que resultan en una reducción de la inmunogenicidad del anticuerpo comparada con el anticuerpo no deshumanizado original respectivo. Uno de los procedimientos para generar dichos anticuerpos mutantes implica la identificación y eliminación de epítomos de células T de la molécula de anticuerpo (Baker y Jones, 2007). En una primera etapa, puede determinarse la inmunogenicidad de la molécula de anticuerpo por

40 varios métodos, por ejemplo, por la determinación *in vitro* de los epítomos de la célula T o la predicción *in silico* de dichos epítomos, como se ha descrito en la bibliografía (Jones et al., 2004; Jones et al., 2005; Reche et al., 2004; Hertz et al., 2006). Una vez que se han identificado los restos críticos para la función de epítomo de la célula T pueden hacerse mutaciones para eliminar la inmunogenicidad y retener la actividad del anticuerpo (Jones et al., 2005; Tangri et al., 2005). Los métodos para introducir mutaciones en proteínas son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por técnicas de PCR con superposición.

45

Como la región Fc de un anticuerpo interacciona con varios receptores de Fc, que resulta en varias capacidades funcionales importantes (que se refieren como "funciones efectoras"), el anticuerpo, en determinadas realizaciones,

50 es un anticuerpo de longitud completa o un anticuerpo que contiene una parte de la región Fc, esto último siempre que el anticuerpo exhiba una unión específica tanto a la parte relevante del antígeno como a los receptores de Fc. La elección del tipo y longitud de la región constante depende de que sean características deseables las funciones efectoras como la fijación de complemento o la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo y de las propiedades farmacológicas deseadas de la proteína de anticuerpo.

55 En una realización de la invención, el anticuerpo anti-CD37 como se define en las reivindicaciones es un anticuerpo quimérico con una región Fc, o la sección relevante de ésta, que se ha modificado por ingeniería para modular las funciones efectoras, en particular para incrementar la unión del anticuerpo a uno o más receptores de Fc, incrementando de esta manera la función efectora ADCC. La modificación por ingeniería de la región Fc media la función efectora del anticuerpo en presencia de células efectoras más eficazmente que la del anticuerpo parental

con Fc no modificada por ingeniería. En una realización, dicha variante de anticuerpo media ADCC que es mayor que la mediada por el anticuerpo parental. (En el texto que sigue, a no ser que se indique otra cosa, el término "parental" en el contexto de una molécula de anticuerpo, o en el contexto de IgG o la región Fc, se refiere a la molécula de anticuerpo, región Fc o IgG no modificada por ingeniería, respectivamente, a partir de la que se obtiene la molécula mutada (modificada por ingeniería)).

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

En las realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención como se definen en las reivindicaciones son variantes de Fc con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 239 y 332, o 236 y 232, o 236 y 332, numeradas de acuerdo con el índice de numeración de la UE Kabat, preferiblemente dichas sustituciones son I332E y S239D o I332E y G236A, o S239D, I332E y G236A.

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

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

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

En los anticuerpos que se definen en las reivindicaciones, las posiciones sustituidas 236, 239 y 332 corresponden a las posiciones 119, 122 y 215, respectivamente, de la cadena pesada de IgG1 mostrada en SEQ ID NO:24. (En la secuencia de longitud completa de la cadena pesada del anticuerpo A2 mostrada en SEQ ID NO: 28, los aminoácidos sustituidos están en las posiciones 235, 238 y 331).

En determinadas realizaciones, las variantes de Fc de los anticuerpos de la invención que se definen en las reivindicaciones están basadas en secuencias de IgG humanas y así se utilizan secuencias de IgG humanas como las secuencias "base" frente a las que se comparan otras secuencias. Para los anticuerpos de la presente invención, la región Fc modificada por ingeniería es preferiblemente IgG, en particular IgG1, pero puede ser también IgG2 o secuencias variantes de otras clases de inmunoglobulinas tales como IgA, IgE, IgD, IgM o versiones quiméricas de dos o más clases de inmunoglobulinas (por ejemplo, IgG2/IgG1) y semejantes. Aunque las variantes de Fc de los anticuerpos de la invención que se definen en las reivindicaciones se modifican por ingeniería en el contexto de una IgG parental, las variantes pueden modificarse por ingeniería en o "transferirse" al contexto de otra segunda IgG parental. Esto se hace determinando los restos y sustituciones "equivalentes" o "correspondientes" entre la primera y segunda IgG, típicamente tomando como base la homología de secuencia o estructural entre las secuencias de la primera y segunda IgG. Con el fin de establecer la homología, la secuencia de aminoácidos de una primera IgG indicada en la presente memoria se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias, utilizando uno o más de los programas de alineamiento de homología conocidos en la técnica, permitiendo las inserciones y deleciones necesarias con el fin de mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de restos conservados por deleción e inserción arbitraria), se definen los restos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la primera variante de Fc. Independientemente de cómo se determinan los restos equivalentes o correspondientes e independientemente de la identidad de la IgG parental en la que se hacen las IgG, lo que se pretende expresar es que las variantes de Fc utilizadas en los anticuerpos de la invención que se definen en las reivindicaciones pueden modificarse por ingeniería en cualquier segunda IgG parental que tiene una homología de secuencia o estructural significativa con la variante de Fc. Así, por ejemplo, si se genera una variante de anticuerpo en la que el anticuerpo parental es IgG1 humana, utilizando los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar los restos equivalentes, la variante del anticuerpo puede modificarse por ingeniería, por ejemplo, en un anticuerpo IgG2 parental humano, un anticuerpo IgA parental humano (véase WO 2007041635).

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

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

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

En un aspecto adicional, una molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención que se define en las reivindicaciones es un fragmento de anticuerpo que se obtiene a partir de un anticuerpo específico CD37 quimérico según la presente invención. Para obtener fragmentos de anticuerpo, por ejemplo fragmentos Fab, la digestión puede conseguirse por medio de técnicas rutinarias, por ejemplo usando papaína. En WO 94/29348 y EEUU 4.342.566 se describen ejemplos de digestión con papaína. La digestión con papaína de anticuerpos produce típicamente dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina da lugar a un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y es todavía capaz de entrecruzar el antígeno.

Los fragmentos Fab obtenidos por digestión del anticuerpo también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH₁) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que contienen restos adicionales en el extremo carboxi del dominio CH₁ de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En la presente memoria, Fab'-SH es la designación de Fab' en el que el o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Los fragmentos de anticuerpos también pueden generarse por métodos de biología molecular que producen los respectivos fragmentos de ADN codificadores.

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

La molécula de anticuerpo anti-CD37 también puede estar en la forma de un conjugado, es decir, una molécula de anticuerpo que está acoplada químicamente a un agente citotóxico, particularmente a un agente citotóxico que induce citotoxicidad (por ejemplo, apoptosis o parada mitótica) de células tumorales. Como resultado de los mecanismos normales de aclaramiento farmacológico, un anticuerpo empleado en un conjugado de fármaco (un "inmunoconjugado") contacta y se une a las células diana sólo en cantidades limitadas. Por lo tanto, el agente citotóxico empleado en el conjugado debe ser altamente citotóxico de manera que se produce una muerte celular suficiente para incitar un efecto terapéutico. Como se describe en EEUU 2004/0241174, los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen taxanos (véanse, por ejemplo, WO 01/38318 y WO 03/097625), agentes alquilantes de ADN (por ejemplo, análogos de CC-1065), antraciclinas, análogos de tubulicina, análogos de duocarmicina, doxorubicina, auristatina E, toxina ricina A y agentes citotóxicos que comprenden un resto de polietilén glicol reactivo (véanse, por ejemplo, Sasse et al., 2000; Suzawa et al., 2000; Ichimura et al., 1991; Francisco et al., 2003; EEUU 5.475.092, EEUU 6.340.701, EEUU 6.372.738 y EEUU 6.436.931, EEUU 2001/0036923, EEUU 2004/0001838, EEUU 2003/0199519 y WO 01/49698).

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

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

En una realización adicional, la molécula anti-CD37 de la invención que se define en las reivindicaciones puede marcarse radiativamente para formar un radioinmunoconjugado, un método sugerido para el anticuerpo anti-CD37 MB-1 (Buchsbaum et al., 1992, véase más arriba). Los radionúclidos con propiedades de radiación ventajosas se conocen en la técnica, los ejemplos son Fósforo-32, Estroncio-89, Itrio-90, Yodo-131, Samario-153, Erblio-169, Iterbio-175, Renio-188, que se han acoplado a MAb de forma exitosa y estable. Las moléculas de anticuerpo anti-

CD37 de la invención que se definen en las reivindicaciones pueden marcarse con varios radionúclidos utilizando métodos de marcaje directo o marcaje indirecto conocidos en la técnica, como se describe en EEUU 6.241.961. Una revisión de las tecnologías para generar y aplicar nuevos conjugados de anticuerpo marcados radiactivamente que son útiles en la presente invención la proporcionan Goldenberg y Sharkey, 2007.

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

- 10 La presente invención también se refiere a moléculas de ADN que codifican las moléculas de anticuerpo anti-CD37 quiméricas o humanizadas de la invención que se definen en las reivindicaciones. Las secuencias que codifican las cadenas pesadas variables de las moléculas de anticuerpo de la invención se muestran en SEQ ID NO:1. Las secuencias que codifican las cadenas ligeras variables de las moléculas de anticuerpo de la invención se muestran en SEQ ID NO:3.

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

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

- 25 Para fabricar los anticuerpos de la invención que se definen en las reivindicaciones, el experto en la técnica puede elegir de una gran variedad de sistemas de expresión muy conocidos en la técnica, por ejemplo, los revisados por Kiprianow y Le Gall, 2004.

- Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, episomas derivados de EBV, y semejantes. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula anfitriona. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados. En ciertas realizaciones, ambas secuencias de ADN se insertan en el mismo vector de expresión. Los vectores convenientes son los que codifican una secuencia de inmunoglobulina humana funcionalmente completa CH o CL, con sitios de restricción apropiados diseñados por ingeniería genética para que cualquier secuencia de VH o VL pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se ha descrito anteriormente. La cadena constante es usualmente kappa o lambda para la cadena ligera del anticuerpo, y para la cadena pesada puede ser, sin limitación, cualquier isotipo de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) u otras inmunoglobulinas, incluyendo las variantes alélicas.
- 30
- 35

- El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo desde una célula anfitriona. El ADN que codifica la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal esté unido al extremo amino del ADN de la cadena del anticuerpo maduro. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido heterólogo de una proteína que no sea una inmunoglobulina. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la cadena del anticuerpo ya puede contener una secuencia del péptido señal.
- 40

- Además de las secuencias de ADN que codifican las cadenas del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes llevan secuencias reguladoras que incluyen promotores, amplificadores, señales de terminación y de poliadenilación y otros elementos de control de la expresión que controlan la expresión de las cadenas del anticuerpo en una célula anfitriona. Los ejemplos de secuencias de promotores (ejemplificados para la expresión en células de mamíferos) son promotores y/o amplificadores derivados de (CMV) (tal como CMV del virus Simian 40 (SV40) (tal como el promotor/amplificador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), promotores derivados de poliomavirus y promotores fuertes de mamíferos tales como promotores nativos de inmunoglobulinas y actinas. Los ejemplos de señales de poliadenilación son BGH polIA, polIA SV40 tardío o temprano; alternativamente, pueden usarse 3'UTR de genes de inmunoglobulinas etc.
- 45
- 50

- Los vectores de expresión recombinantes también pueden llevar secuencias que regulen la replicación del vector en las células anfitrionas (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada o una parte de unión al antígeno de ésta y/o la cadena ligera o una parte de unión al antígeno de ésta de un anticuerpo anti-CD37 y los vectores que comprenden estas moléculas de ADN pueden introducirse en células anfitrionas, por ejemplo células bacterianas o células eucariotas superiores, por ejemplo células de mamíferos, según métodos de transfección muy conocidos en la técnica, que incluyen transfección mediada por liposomas, transfección mediada por policationes, fusión de protoplastos,
- 55

microinyecciones, precipitación con fosfato de calcio, electroporación o transferencia mediante vectores virales.

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

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

Las moléculas de anticuerpos se recuperan preferiblemente del medio de cultivo como un polipéptido secretado o pueden recuperarse de lisados de células anfitrionas si, por ejemplo, se expresan sin una señal secretora. Es necesario purificar las moléculas del anticuerpo usando métodos estándar de purificación de proteínas usados para proteínas recombinantes y proteínas de células anfitrionas de manera que se obtengan preparaciones sustancialmente homogéneas del anticuerpo. Como ejemplo, los métodos de purificación de última generación útiles para obtener la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención que se define en las reivindicaciones incluyen, como una primera etapa, la separación de las células y/o de los restos celulares en forma de partículas del medio de cultivo o del lisado. A continuación, el anticuerpo se purifica de las proteínas, polipéptidos y ácidos nucleicos contaminantes solubles, por ejemplo, por fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio de iones, precipitación en etanol, HPLC en fase reversa, cromatografía en Sefadex, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio de cationes. Como etapa final del proceso para obtener una preparación de molécula de anticuerpo anti-CD37, la molécula de anticuerpo purificada puede secarse, por ejemplo liofilizarse, como se describe más adelante para las aplicaciones terapéuticas.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene, como ingrediente activo, la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención que se define en las reivindicaciones.

Para ser usado en terapia, el anticuerpo anti-CD37 se incluye en composiciones farmacéuticas apropiadas para facilitar la administración a animales o a seres humanos. Pueden prepararse formulaciones típicas de la molécula de anticuerpo anti-CD37 mezclando la molécula de anticuerpo anti-CD37 con vehículos, excipientes o agentes estabilizantes aceptables fisiológicamente, en forma de formulaciones liofilizadas o secadas de cualquier otra forma o disoluciones acuosas o suspensiones acuosas o no acuosas. Los vehículos, excipientes, agentes modificadores o agentes estabilizantes no son tóxicos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Incluyen sistemas tamponadores tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos o inorgánicos y sus sales; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; agentes conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil-parabenos tales como metil o propil-paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona o polietileno glicol (PEG); aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos o otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, sacarosa, trehalosa, dextrinas o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares alcoholes tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos iónicos o no iónicos tales como TWEEN™ (polisorbatos), PLURONICS™ o ésteres de ácidos grasos, éteres de ácidos grasos o ésteres de azúcares. En la formulación del anticuerpo también pueden estar contenidos disolventes orgánicos tales como etanol o isopropanol. Los excipientes también pueden tener una función modificadora de la liberación o modificadora de la absorción.

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

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

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

La molécula de anticuerpo anti-CD37 también puede estar contenida en una preparación de liberación sostenida. Dichas preparaciones incluyen matrices sólidas, semisólidas o líquidas de polímeros hidrofóbicos o hidrofílicos y pueden estar en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, barras o microcápsulas y pueden aplicarse mediante un dispositivo de aplicación. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o acetato butirato de sacarosa), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (EEUU 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y y etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y a posibles cambios en la inmunogenicidad. Dependiendo del mecanismo implicado pueden idearse estrategias racionales para la estabilización. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares por medio del intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilización (como, por ejemplo, se describe en WO 89/011297) en disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

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

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

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

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

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, de la gravedad y del curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico que atiende. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

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

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

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

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

Las malignidades de las células B incluyen, sin limitación, linfomas de células B (por ejemplo, varias formas de la enfermedad de Hodgkin, linfoma de células B no-Hodgkin (NHL) y linfomas relacionados (por ejemplo, macroglobulinemia de Waldenström (también denominada linfoma linfoplasmacítico o inmunocitoma) o linfomas del sistema nervioso central), leucemias (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL; también denominada leucemia linfocítica crónica de células B BCLL), leucemia de células vellosas y leucemia mioblástica crónica) y mielomas (por ejemplo, mieloma múltiple). Las malignidades de las células B adicionales incluyen linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma esplénico

de la zona marginal, mieloma múltiple, plasmacitoma solitario del hueso, plasmacitoma extraóseo, linfoma de células B de la zona marginal extra-nodal del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de células B grandes difusas, linfoma de células B grandes del mediastino (tímico), linfoma intravascular de células B grandes, linfoma primario de cavidades, linfoma/leucemia de Burkitt, linfoma de la zona gris, proliferaciones de células B con un potencial maligno indeterminado, granulomatosis linfomatoide y trastorno linfoproliferativo posterior a trasplantes.

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

Dichas enfermedades incluyen, pero no están limitadas a: artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, policondritis, artritis psoriásica, psoriasis, dermatitis, polimiositis/dermatomiositis, miositis de cuerpos de inclusión, miositis inflamatoria, necrosis epidérmica tóxica, escleroderma y esclerosis sistémica, síndrome de CREST, respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria del intestino delgado, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de distrés respiratorio, síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS), meningitis, encefalitis, uveitis, colitis, glomerulonefritis, condiciones alérgicas, eccema, asma, condiciones que implican infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmune, deficiencia en la adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus discoide, lupus mielitis, lupus cerebritis, diabetes juvenil, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica, neuromielitis óptica, fiebre reumática, corea de Sydenham, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis de Wegener y enfermedad de Churg-Strauss, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis/angiitis por hipersensibilidad, ANCA y vasculitis reumatoide), anemia aplásica, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmune incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, aplasia de células rojas pura (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (CNS), síndrome de daño orgánico múltiple, miastenia gravis, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad por anticuerpos anti-membrana basal glomerular, síndrome del anticuerpo anti-fosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo de trasplante de órganos sólidos, enfermedad de injerto frente a anfitrión (GVHD), penfigoide ampolloso, pénfigo, poliendocrinopatías autoinmunes, espondiloartropatías seronegativas, enfermedad de Reiter, síndrome de la persona rígida, arteritis de células gigantes, nefritis por complejo inmune, nefropatía IgA, polineuropatías IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), púrpura de Henoch-Schönlein, trombocitopenia autoinmune, enfermedad autoinmune de los testículos y ovarios incluyendo orquitis y ooforitis autoinmune, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunes incluyendo tiroiditis autoinmune, tiroiditis crónica (Tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes poliglandulares endocrinopáticos), diabetes de Tipo I también referida como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmune, neumonitis linfocítica intersticial (HIV), bronquiolitis obliterante (no-trasplante) vs NSIP, Síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos medios (incluyendo la enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), poliarteritis nodosa (PAN), espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger (nefropatía IgA), glomerulonefritis de progresión rápida, cirrosis biliar primaria, sprue celíaco (enteropatía por gluten), crioglobulinemia, crioglobulinemia asociada con hepatitis, esclerosis amiotrófica lateral (ALS), enfermedad arterial coronaria, fiebre Mediterránea familiar, poliangiitis microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott-Aldrich y tromboangiitis obliterante (véase WO 2007/014278).

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

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

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede ser, sin limitación, uno o más inhibidores seleccionados del grupo de inhibidores de la familia EGFR, familia VEGFR, IGF-1R, Receptores de la insulina, AuroraA, AuroraB, PLK y PI3 quinasa, FGFR, PDGFR, Raf, KSP o PDK1.

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

Los ejemplos de inhibidores de Aurora son, sin limitación, PHA-739358, AZD-1152, AT-9283, CYC-116, R-763, VX-

667, MLN-8045, PF-3814735, SNS-314, VX-689, GSK-1070916, TTP-607, PHA-680626, MLN-8237 y ENMD-2076.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20 Los ejemplos de inhibidores de Flt3 son AC-220 (también un inhibidor de cKit y PDGFR), KW-2449, LS-104 (también un inhibidor de bcr-abl y Jak2), MC-2002, SB-1317, lestaurtinib (también un inhibidor de VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348 (también un inhibidor de JAK2), XL-999 (también un inhibidor de cKit, FGFR, PDGFR y VEGFR), sunitinib (también un inhibidor de PDGFR, VEGFR y cKit) y tandutinib (también un inhibidor de PDGFR y cKit).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 951, ZK-CDK (también un inhibidor de CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiDs, talidomida, CC-4047, lenalidomida, ENMD-0995, IMC-D11, Ki-23057, brivanib, cediranib, 1B3, CP-868596, IMC-3G3, R-1530 (también un inhibidor de Flt3), sunitinib (también un inhibidor de cKit y Flt3), axitinib (también un inhibidor de cKit), lestaurtinib (también un inhibidor de Flt3 y PKC), vatalanib, tandutinib (también un inhibidor de Flt3 y cKit), pazopanib, PF-337210, aflibercept, E-7080, CHIR-258, tosilato de sorafenib (también un inhibidor de Raf), vandetanib, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (también un inhibidor de EGFR y Her2), BAY-57-9352 (también un inhibidor de Raf), BAY-73-4506 (también un inhibidor de Raf), XL-880 (también un inhibidor de cMet), XL-647 (también un inhibidor de EGFR y EphB4), XL-820 (también un inhibidor de cKit), nilotinib (también un inhibidor de cKit y bcr-abl), CYT-116, PTC-299, BMS-584622, CEP-11981, dovitinib, CY-2401401 y ENMD-2976.
- 5 El agente terapéutico adicional también puede seleccionarse de inhibidores de EGFR, puede ser una molécula pequeña inhibidora de EGFR o un anticuerpo anti-EGFR. Los ejemplos de anticuerpos anti-EGFR, sin limitación, son cetuximab, panitumumab, nimotuzumab, zalutumumab; los ejemplos de moléculas pequeñas inhibidoras de EGFR son gefitinib, erlotinib y vandetanib (también un inhibidor de VEGFR). Otro ejemplo de un agente modulador de EGFR es la toxina de fusión EGF.
- 10 Los inhibidores adicionales de EGFR y/o Her2 útiles para combinarse con una molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención que se definen en las reivindicaciones son lapatinib, trastuzumab, pertuzumab, XL-647, neratinib, BMS-599626 ARRY-334543, AV-412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (también un inhibidor de VEGFR), AZD-8931, ARRY-380 ARRY-333786, IMC-11F8, Zemab, TAK-285, AZD-4769.
- 15 El fármaco adicional también puede seleccionarse de agentes dirigidos a las rutas de señalización de IGF-1R y del receptor de la insulina. Dichos agentes incluyen anticuerpos que se unen a IGF-1R (por ejemplo, CP-751871, AMG-479, IMC-A12, MK-0646, AVE-1642, R-1507, BIIB-022, SCH-717454, rhu Mab IGF1 y entidades químicas nuevas dirigidas al dominio quinasa de IGF1-R (por ejemplo, OSI-906 o BMS-554417, XL-228, BMS-754807).
- 20 Otros agentes que pueden combinarse ventajosamente en una terapia con la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención que se define en las reivindicaciones son moléculas dirigidas a CD20, incluyendo anticuerpos específicos de CD20 como rituximab, LY-2469298, ocrelizumab, MEDI-552, IMMU-106, GA-101 (= R7159), XmAb-0367, ofatumumab, anticuerpos frente a CD20 marcados radiactivamente como tositumumab e ibritumomab tiuxetan u otras proteínas dirigidas a CD20 como SMIP Tru015, PRO-131921, FBT-A05, velutuzumab, R-7159.
- 25 Los anticuerpos CD37 pueden combinarse con inhibidores de otros antígenos de superficie expresados en leucocitos, en particular anticuerpos o moléculas semejantes a anticuerpos, por ejemplo, anti-CD2 (sipilzumab), anti-CD4 (zanolimumab), anti-CD19 (MT-103, MDX-1342, SAR-3419, XmAb-5574), anti-CD22 (epratuzumab), anti-CD23 (lumiliximab), anti-CD30 (iratumumab), anti-CD32B (MGA-321), anti-CD38 (HuMax-CD38), anti-CD40 (SGN40), anti-CD52 (alemtuzumab), anti-CD80 (galiximab). Un anticuerpo de la invención que se define en las reivindicaciones también puede combinarse con otro antagonista de CD37, por ejemplo, TRU-016.
- 30 Otros agentes que pueden combinarse con anticuerpos CD37 son inmunotoxinas como BL-22 (una inmunotoxina anti-CD22), inotuzumab ozogamicin (un conjugado anticuerpo anti-CD23-caliqueamicina), RFT5.dgA (cadena A de la toxina Ricina anti-CD25), SGN-35 (un conjugado anti-CD30-auristatina E) y gemtuzumab ozogamicina (un conjugado anti-CD33 caliqueamicina), MDX-1411 (conjugado anti-CD70) o anticuerpos marcados radiactivamente como ⁹⁰I-epratuzumab (radioinmunoconjugado anti-CD22).
- 35 Además, los anticuerpos anti-CD37 pueden combinarse con agentes inmunomoduladores, por ejemplo, anticuerpos, que inducen apoptosis o modifican las rutas de transducción de las señales como los moduladores del receptor TRAIL mapatumumab (un agonista del receptor TRAIL-1), lexatumumab (un agonista del receptor TRAIL-2), tigatuzumab, Apomab, AMG-951 y AMG-655; , un anticuerpo anti-HLA-DR (como 1D09C3), un anti-CD74, un inhibidor del ligando del factor de diferenciación de osteoclastos (como denosumab), un antagonista de BAFF (como AMG-623a) o un agonista de un receptor semejante a Toll (por ejemplo, TLR-4 o TLR-9).
- 40 Otros fármacos que pueden utilizarse en combinación con las moléculas de anticuerpo anti-CD37 de la presente invención que se definen en las reivindicaciones se seleccionan de, pero no se limitan a, hormonas, análogos de hormonas y antihormonas (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, fulvestrant, acetato de megestrol, flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona, finasterida, acetato de buserelina, fludrocortisona, fluoximesterona, medroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesterona, dietilestilbestrol, propionato de testosterona, fluoximesterona/equivalentes, octreotida, arzoxifeno, pasireotida, vapreotida, adrenocorticosteroides/antagonistas, prednisona, dexametasona, ainoglutetimida), inhibidores de aromataza (por ejemplo, anastrozol, letrozol, liarozol, exemestano, atamestano, formestano), agonistas y antagonistas de LHRH (por ejemplo, acetato de goserelina, leuprolida, abarelix, cetorelix, deslorelina, histrelina, triptorelina), antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos como metotrexato, trimetrexato, pemetrexed, análogos de pirimidina como 5-fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, capecitabina, decitabina, nelarabina, 5-azacitidina y gemcitabina, análogos de purina y adenosina tales como mercaptopurina, tioguanina, azatioprina, cladribina y pentostatina, citarabina, fludarabina, clofarabina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas como doxorubicina, daunorubicina, epirubicina e idarubicina, mitomicina-C, bleomicina dactinomycin, plicamicina, esplicamicina, actimomicina D, mitoxantrona, mitoxantroneidarubicina, pixantrona, estreptozocina, afidicolina); derivados del platino (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino,
- 45
- 50
- 55

lobaplatino, satraplatino); agentes alquilantes (por ejemplo, estramustina, semustina, mecloretamina, melfalán, clorambucilo, busulfán, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida, hidroxurea, temozolomida, nitrosoureas tales como carmustina y lomustina, tiotepa); agentes antimetabólicos (por ejemplo, alcaloides de la vinca como vinblastina, vindesina, vinorelbina, vinflunina y vincristina; y taxanos como paclitaxel, docetaxel y sus formulaciones, larotaxel; simotaxel, y epotilonas como ixabepilona, patupilona, ZK-EPO); inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas como etopósido y etopofos, teniposida, amsacrina, topotecán, irinotecán, banoxantrona, camptotecina) y quimioterapéuticos misceláneos tales como derivados del ácido retinoico, amifostina, anagrelida, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interleuquina-2, procarbazona, N-metilhidrazina, mitotano y porfimer, bexaroteno, celecoxib, etilenmina/metil-melamina, trietilenmelamina, trietilen tiosforamida, hexametilmelamina y enzimas L-asparaginasa, L-arginasa y metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, RSU 1069, EO9, RB 6145, SR4233, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina, 5-yododesoxiuridina, bromodesoxicidina, eritrohidroxinonil-adenina, antracendiona, GRN-163L (un antagonista competitivo del molde de telomerasa), SDX-101 (un agonista de PPAR), talabostat (un inhibidor de DPP), forodesina (un inhibidor de PNP), atacicept (un receptor soluble dirigido a los miembros de la familia TNF BlyS y APRIL), agentes neutralizantes de TNF-alfa (Enbrel, Humira, Remicade), XL-844 (un inhibidor de CHK1/2), VNP-40101M (un agente alquilante de ADN), SPC-2996 (un inhibidor antisentido de bcl2), obatoclax (un inhibidor de bcl2), enzastaurin (un modulador de PKC beta), vorinostat (un inhibidor de HDAC), romidepsina (un inhibidor de HDAC), AT-101 (un inhibidor de Bcl-2/Bcl-xL), plitidepsina (un depsipéptido con múltiples acciones), SL-11047 (un modulador del metabolismo de las poliaminas).

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

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

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

Otra posibilidad en el caso en el que no exista reactividad cruzada animal de los anticuerpos monoclonales es la generación de un anticuerpo denominado sustituto. Un anticuerpo sustituto es un anticuerpo que reacciona con la proteína homóloga de una especie animal que es relevante y útil para la investigación de los efectos farmacodinámicos y tóxicos, por ejemplo, el ratón o el mono *cinomolgus*. En el caso de CD37, se desarrollan anticuerpos monoclonales que son específicos para CD37 de macaco o CD37 de ratón, respectivamente. Idealmente, dicho anticuerpo sustituto debería tener propiedades similares de unión y funcionales respecto al anticuerpo de desarrollo. Esto puede investigarse mediante la utilización de sistemas de ensayo que utilizan células que expresan CD37 de macaco o de ratón como células diana, por ejemplo, para unión, análisis de Scatchard por FACS, ensayos de ADCC y apoptosis. Finalmente, el anticuerpo sustituto puede seleccionarse gracias a su actividad supresora de células B en sangre de macaco o de ratón *in vitro*.

Descripción Breve de las Figuras:

Fig. 1: El Anticuerpo Quimérico A0 reconoce específicamente el antígeno CD37, determinado por ensayo de competición por FACS

Fig. 2: Unión de versiones humanizadas de A0 al antígeno CD37 celular, determinada por FACS

Fig. 3: Unión de versiones humanizadas de A0 al antígeno CD37 celular, determinada por FACS

Fig. 4: Afinidad de versiones humanizadas de A0 por el antígeno CD37 celular, determinada por análisis de scatchard por FACS

Fig. 5: Actividad ADCC de versiones humanizadas de A0 en células Ramos

Fig. 6: Actividad pro-apoptótica de versiones humanizadas de A0 en células Ramos

5 Fig. 7: Actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0 en células Ramos

Fig. 8: Actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb B0 en células Ramos

Fig. 9: Actividad pro-apoptótica de mAb A0 y B0

Fig. 10: Actividad pro-apoptótica de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0

10 Fig. 11 A: Supresión de células B humanas normales en un ensayo con sangre completa por anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería en comparación con Rituximab

Fig. 11 B: Actividad supresora de células B superior de los anticuerpos después de la modificación de Fc por ingeniería en comparación con Rituximab

Fig. 11 C: Los anticuerpos A2 y B2 no agotan las células T ni los monocitos en ensayos con sangre completa

Fig. 12: Actividad ADCC superior después de la modificación de Fc por ingeniería comparada con Rituximab

15 Fig. 13: Supresión de células Ramos del linfoma de Burkitt en un ensayo con sangre completa por anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería en comparación con Rituximab

Fig. 14: Inhibición del crecimiento tumoral in vivo de tumores de xenoinjerto Ramos en ratones desnudos por anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería

Fig. 15: Expresión de CD37 en células de mieloma múltiple

20 Fig. 16: Actividad ADCC de los anticuerpos A2 y B2 en células de mieloma múltiple

Fig. 17: Actividad pro-apoptótica de los anticuerpos A2 y B2 en células CLL obtenidas de pacientes

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados

a) Generación del anticuerpo quimérico A0

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

b) Generación de versiones humanizadas del anticuerpo quimérico A0

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

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

hVK3, hVH1A y hVH3 y se combinan para producir modelos Fv. El injerto de bucles se realiza incluyendo las regiones CDR del mAb A0 murino en los marcos de anticuerpo humano y se sintetizan las moléculas de ADN de las construcciones de cadenas humanizadas.

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

Tabla 1

Secuencias de cadenas pesadas y ligeras variables de los anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados utilizados en los Ejemplos.		
Anticuerpo	Cadena Pesada SEQ ID NO: aa/ADN	Cadena Ligera SEQ ID NO: aa/ADN
A (=A0)	seq 2/1	seq 4/3
B	seq 6/5	seq 12/11
C	seq 6/5	seq 14/13
D	seq 6/5	seq 16/15
H	seq 8/7	seq 18/17
I	seq 8/7	seq 20/19
J	seq 8/7	seq 22/21
K	seq 10/9	seq 18/17
L	seq 10/9	seq 20/19
M	seq 10/9	seq 22/21

- 10 c) Generación de anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados con Fc modificada por ingeniería
- La generación de mutantes de Fc se realiza como describen Lazar et al., 2006. La secuencia de cadena pesada con Fc modificada por ingeniería resultante se introduce en el vector de expresión pAD-CMV1 (descrito en EP 393 438) y se co-transfecta junto con un plásmido que contiene la secuencia codificadora de la cadena ligera en células CHO-DG44. El anticuerpo se recoge del medio de cultivo celular 5 a 7 días después de la transfección y se purifica mediante cromatografía en proteína A, se eluye en un tampón citrato y se dializa en PBS. El contenido proteico de las muestras se determina mediante Proteína A HPLC, el contenido en endotoxinas se determina mediante Kinetic-QCL Kinetic Chromogenic Assay (Lonza). El contenido en monómero de las muestras se determina mediante HP-SEC, todas las muestras utilizadas para el ensayo funcional muestran un contenido en monómero > 95%.
- 15

Tabla 2

Secuencias de cadenas pesadas y ligeras variables y mutaciones en Fc de los anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados (el anticuerpo A0, B0, C0 etc. es idéntico al anticuerpo A y B, C etc. de la Tabla 1). Algunos de los anticuerpos mutados se ejemplifican por las secuencias de longitud completa de su cadena pesada y ligera.					
Las secuencias de longitud completa de las cadenas ligeras y pesadas se enumeran en las columnas V y VI. (Las secuencias en la columna V marcadas con * se refieren a la secuencia IgG1 de SEQ ID NOs 24 y 23 (secuencias de tipo nativo) que han sido modificadas para que tengan la(s) sustitucion(es) correspondientes a la columna II, y la(s) mutacion(es) respectiva(s) en el ADN codificante).					
I	II	III	IV	V	VI
Ab	Sustitución o sustituciones en Fc (numeración de Kabat)	SEC ID N°: v cadena pesada aa/ADN	SEC ID N°: v cadena ligera aa/ADN	SEC ID N°: cadena pesada completa aa/ADN	SEC ID N°: cadena ligera completa aa/ADN
A0	-	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fusionada a 24/23	4/3 fusionada a 26/25
A1	I332E	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fusionada a 24*/23*	4/3 fusionada a 26/25

ES 2 555 202 T3

A2	S239D/I332E	seq 2/1	seq 4/3	28/27	30/29
A3	I332E/G236A	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fusionada a 24*/23*	4/3 fusionada a 26/25
A4	S239D/I332E/G236A	seq 2/1	seq 4/3	32/31	34/33
B0	-	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fusionada a 24/23	12/11 fusionada a 26/25
B1	I332E	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fusionada a 24*/23*	12/11 fusionada a 26/25
B2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 12/11	36/35	38/37
B3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fusionada a 24*/23*	12/11 fusionada a 26/25
B4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 12/11	40/39	42/41
C0	-	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24/23	14/13 fusionada a 26/25
C1	I332E	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
C2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
C3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
C4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
D0	-	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24/23	16/15 fusionada a 26/25
D1	I332E	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25
D2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25
D3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25
D4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25
H0	-	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24/23	18/17 fusionada a 26/25
H1	I332E	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
H2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
H3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
H4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
I-0	-	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24/23	20/19 fusionada a 26/25
I-1	I332E	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
I-2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
I-3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
I-4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
J0	-	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24/23	22/21 fusionada a 26/25
J1	I332E	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
J2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
J3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
J4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25

K0	-	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24/23	18/17 fusionada a 26/25
K1	I332E	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
K2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
K3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
K4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
L0	-	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24/23	20/19 fusionada a 26/25
L1	I332E	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
L2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
L3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
L4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
M0	-	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24/23	22/21 fusionada a 26/25
M1	I332E	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
M2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
M3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
M4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25

Ejemplo 2

El mAb quimérico A0 reconoce específicamente el antígeno CD37

- La especificidad del MAb A0 para CD37 celular se ensaya en un ensayo de competición por FACS en células Ramos de linfoma de Burkitt (ATCC #CRL-1596). Las células se crecen en frascos de cultivo de tejidos (175 cm²) utilizando RPMI-1640 + GlutaMAX suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 12,5 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 1% de MEM aminoácidos no esenciales como medio de cultivo. Las células se cultivan con una densidad inicial de 3×10^5 células/ml a 37°C y 5% CO₂ en una atmósfera humidificada durante tres días. Los cultivos se mantienen a una concentración celular entre 3×10^5 y $1,8 \times 10^6$ /ml por sub-cultivo en una proporción 1:6 con medio de cultivo fresco 2-3 veces por semana. Para el análisis de competición por FACS, se utiliza el mAb HH1 específico de CD37 (Santa Cruz) marcado directamente con ficoeritrina (PE) a una concentración de 1 µg/ml. El anticuerpo se preincuba con el anticuerpo competidor sin marcar A0 durante 10 min a 4°C en la proporción molar indicada. Posteriormente, se incuban 1×10^5 células Ramos durante 30 min con la mezcla de anticuerpos en hielo. Posteriormente, las células se lavan dos veces en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), se resuspenden en tampón FACS y se miden en un BD FACS Canto. Los resultados de dicho ensayo se muestran en la Figura 1. La adición de un anticuerpo IgG1 control humano (Sigma IgG1 kappa) en un exceso molar de 20 veces no reduce significativamente la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células Ramos. La adición del anticuerpo HH1 o del anticuerpo A0 sin marcar en un exceso molar de 20 veces suprimió casi completamente la unión del anticuerpo HH1 marcado directamente. Esto indica que los anticuerpos A0 y HH1 reconocen epítomos idénticos o similares en las células Ramos y que compiten para unirse al antígeno CD37 celular.

Ejemplo 3

Unión de versiones humanizadas del mAb A0 al antígeno CD37 celular

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

Ejemplo 4

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

La afinidad de las versiones humanizadas del anticuerpo A0 (designadas B, C, D, H, I y K; véase la Tabla 1) para el antígeno CD37 celular se determina por análisis scatchard por FACS como se describe en otra parte (Brockhoff et al., 1994). Brevemente, se preparan diluciones del anticuerpo en una placa de 96 pocillos empezando con 100-400 nM en el primer pocillo (80 µl), seguido de 11 etapas de dilución (1:2, 40 + 40 µl). 50 µl de las diluciones del mAb se añaden a tubos FACS, 150 µl de células ($0,8 \times 10^6$ /ml = $1,2 \times 10^5$ células/tubo) se añaden a cada tubo FACS. Las células se mezclan suavemente y se incuban durante 1 h en hielo. Posteriormente, se añaden 50 µl de anticuerpo secundario conjugado con FITC (conc. 15 µg/ml; mAb de ratón anti-todas las subclases de IgG humana, Zymed 05-4211) se mezcla y se incuba durante 30 min. en hielo. Posteriormente, se añaden 4 ml de PBS pH 7,2 que contiene 0,02% de ácido, las células se sedimentan y se resuspenden en 300 µl de PBS pH 7,2 y se someten a análisis por FACS utilizando un BD FACS Canto. Todas las etapas experimentales se realizan en hielo común, todas las diluciones de anticuerpo se hacen en PBS/ 0,5%BSA + 0,02% de ácido. La calibración de FACS se realiza utilizando Quantum FITC MESF (Premix) High Level Beads (Bangs Laboratories). Todas las muestras se miden utilizando los mismos parámetros FACS. La proporción de IgG unida frente a IgG libre se calcula a partir de los valores MFI a diferentes concentraciones de anticuerpo y se muestran como una representación scatchard. La Figura 4 muestra la relación MFI/ concentración de anticuerpo de varias variantes humanizadas de A0. Los resultados muestran una unión similar a las células Ramos de algunas de las versiones humanizadas respecto al anticuerpo de partida, con constantes de disociación (K_d) que varían de 2,15 a 4,90 nanomoles/litro.

Ejemplo 5

Actividad ADCC de versiones humanizadas del mAb quimérico A0

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

Se utilizan aproximadamente 50 - 80 ml de sangre completa obtenida de donantes sanos para el aislamiento de PBMC. Se diluyen 10 ml de sangre completa 1:3,6 con 26 ml de HBSS (Disolución Salina Equilibrada de Hanks sin calcio ni magnesio) en un tubo de 50 ml. Se pone una capa con 18 ml de sangre completa diluida encima de 12 ml de Lymphoprep (Nycomed Pharma) en un tubo de 50 ml y se centrifuga a 370 x g (1.400rpm) durante 35 min. Las células mononucleares de la interfase se aspiran y se lavan primero con HBSS (750 x g, es decir, 1.900 rpm; 10 min) y una segunda vez con HBSS (300 x g, es decir, 1.200 rpm; 10 min) y por último con HBSS (160 x g, es decir, 900 rpm; 10 min). Las células sedimentadas se resuspenden suavemente en medio de cultivo/medio de ensayo (10% de suero AB humano inactivado con calor en RPMI 1640 sin L-glutamina) utilizando una pipeta y el número de células se determina en el contador celular. La concentración de PBMC se ajusta a 1×10^7 /ml. Las PBMC recién aisladas (5×10^5 /ml) se mantienen en medio de cultivo (RPMI 1640 sin L-glutamina suplementado con 10% de suero AB humano) en un frasco de cultivo de tejidos (75 cm²) a 37°C en un incubador con CO₂ toda la noche. Al día siguiente, las células se estimulan con IL-2h a una concentración final de 1 U/ml durante 3 días más. Las PBMC estimuladas con IL-2 se separan de los restos celulares en un gradiente Lymphoprep. Las PBMC estimuladas con IL-2 purificadas se suspenden en medio de cultivo/medio de ensayo a una concentración de 1×10^7 /ml.

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

disolución de tinción) a cada pocillo y se incuba 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Después, se mide la absorbancia como se describe a continuación.

- Se utiliza el Kit de Detección de la Citotoxicidad (LDH; Roche) para medir la actividad ADCC. La detección de la citotoxicidad se basa en la medida de la actividad de la enzima LDH liberada de la membrana plasmática de las células dañadas. La LDH liberada en los sobrenadantes del cultivo reduce la sal de tetrazolio del kit a formazán. El máximo de absorción del colorante formazán se mide a 490 nm frente a una longitud de onda de referencia de 650 nm en un lector de placas ELISA. Para calcular el porcentaje de citotoxicidad mediada por células se realizan cinco controles en cada experimento.

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

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

Ejemplo 6

Actividad pro-apoptótica de versiones humanizadas del mAb quimérico A0

La actividad pro-apoptótica del mAb A0 (=A) y las versiones humanizadas de éste

- (B, C, D y I; véase la Tabla 1) se evalúa midiendo las células AnexinaV/ PI positivas después de la incubación de las células Ramos con los mAb. Las células Ramos (linfoma de Burkitt; ATCC #CRL-1596) se reciben de ATCC. Las células se crecen en frascos de cultivo de tejidos (175 cm²) utilizando RPMI-1640 + GlutaMAX suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 12,5 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 1% de MEM aminoácidos no esenciales como medio de cultivo. Las células se cultivan con una densidad inicial de 3x10⁵ células/ml a 37°C y 5% CO₂ en una atmósfera humidificada durante tres días. Los cultivos se mantienen a una concentración celular entre 3x10⁵ y 1,8x10⁶/ml por sub-cultivo en una proporción 1:6 con medio de cultivo fresco 2-3 veces por semana. Una alícuota del cultivo celular a una densidad celular entre 1,5x10⁶/ml y 1,8x10⁶/ml y creciendo en la fase log se centrifuga (200 x g, es decir, 1.000 rpm) durante 10 min. Las células se lavan una vez con medio de lavado (RPMI 1640 sin L-glutamina) y se sedimentan (200 x g, es decir, 1.000 rpm; 10 min). El sedimento celular se resuspende en medio de cultivo y se determina el número de células. La concentración celular se ajusta a 1x10⁶/ml. Se plaquean 100 µl de suspensión celular por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Los anticuerpos se diluyen en medio de cultivo celular que contiene 10% de FBS y se añaden por pocillo 100 µl de disolución de anticuerpo. Las células se incuban durante 20 a 24 hrs a 37°C en un incubador con CO₂ y posteriormente se tiñen con el kit #2 de ensayo de apoptosis Vybrant. Se añaden Anexina V marcada con Alexa Fluor 488 y disolución de yoduro de propidio a las células y se incuban durante 15 min en oscuridad. Posteriormente, las células se resuspenden en 400 µl de tampón de unión de AnexinaV y se someten a análisis FACS utilizando un BD FACS Canto. El porcentaje de células AnexinaV positivas/ PI negativas y AnexinaV/ PI positivas se determina en hibridaciones sobre mancha bidimensionales utilizando los canales FL1/ FL2. Como control negativo se utiliza un anticuerpo correspondiente en isotipo que no se une (Sigma IgG1 humana).

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

Ejemplo 7

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

La actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0 (designadas A1, A2, A3, A4, véase la Tabla 2) se evalúa utilizando células Ramos como células diana. El ensayo de ADCC se realiza como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). El resultado del experimento se muestra en la Figura 7. Las versiones con Fc modificada por ingeniería de A0 muestran una potencia y eficacia claramente mejoradas comparadas con el mAb A0 parental. Determinadas variantes de Fc muestran una mejora en la lisis máxima de hasta el 100% comparada con el mAb parental y una mejora en la CE₅₀ de hasta 10 veces comparada con el mAb parental. En conclusión, la introducción de mutantes de Fc específicos incrementa de forma importante la actividad ADCC del mAb quimérico A0.

Ejemplo 8

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

La actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb B0 (designadas B1, B2, B3, B4; véase la Tabla 2) se evalúa utilizando células Ramos como células diana. El ensayo de ADCC se realiza como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). Las versiones con Fc modificada por ingeniería de B0 muestran una potencia y eficacia claramente mejoradas comparadas con el mAb B0 parental. Determinadas variantes de Fc muestran una mejora en la lisis máxima de hasta el 80% comparada con el mAb parental y una mejora en la CE₅₀ de hasta 20 veces comparada con el mAb parental. En conclusión, la introducción de mutantes de Fc específicos incrementa de forma importante la actividad ADCC del mAb B0 humanizado. Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 9

Actividad pro-apoptótica de los mAb A0 y B0

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

Ejemplo 10

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

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

Ejemplo 11

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

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

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

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

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

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

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

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

c) Los anticuerpos A2 y B2 no agotan las células T ni los monocitos en ensayos con sangre completa

El efecto de A2 y B2 sobre los linfocitos T (CD3-positivos) y los monocitos (CD14-positivos) se estima en paralelo al efecto sobre los linfocitos B. No se observan cambios significativos en los números de células T ni en los números de monocitos, mientras que se ve una reducción significativa del número de células B (Figura 11C). Esto indica que A2 y B2 agotan específicamente las células B de sangre humana.

Ejemplo 12

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

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

Pro-apoptotic activity of antibodies A2 and B2 on patient-derived CLL cells

The pro-apoptotic activity of A2 and B2 is assessed on patient-derived chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are prepared from a patient with diagnosed CLL, after informed consent according to the declaration of Helsinki has been obtained. The primary CLL cells are purified from freshly collected blood according to Ficoll-Paque® plus procedure (StemCell Technologies, Meylan, France) and stored at 4°C in RPMI 1640 culture medium containing 10 % heat inactivated human AB serum (Sigma, France) until use. The culture medium for primary CLL cells is RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine and 10% of heat inactivated human AB serum. For experimental use, primary CLL cells are counted in a hemocytometer and their viability is assessed by 0.25% trypan blue exclusion. The viability of CLL samples is more than 90%. Cells are incubated at 37°C for 24 hours with the antibodies at 30 µg/ml and thereafter the percentage of AnnexinV positive cells is determined as described in Example 6. As shown in Figure 17, Fc-engineered antibodies A2 and B2 show strong pro-apoptotic activity on the primary CLL cells with about 90% (A2) and 40% (B2) AnnexinV positive cells. Both mAbs are clearly superior to rituximab, a B cell-specific antibody approved for the treatment of B-NHL. Mab A2 demonstrates also clearly superior activity compared to alemtuzumab, an antibody approved for the treatment of B-CLL.

Ejemplo 13

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

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

Ejemplo 14

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

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

Ejemplo 15

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

- Utilizando el modelo de xenoinjerto de tumor de Ramos se establece una correlación entre las concentraciones séricas de A2 y B2 respecto a su efecto farmacodinámico en ratones. Estos estudios demuestran que una dosis de 8 mg/kg de A2 y B2 (formulada en tampón citrato: 25 mM Na-Citrato, 115 mM NaCl, 0,04% Tween 80, pH 6,0) causa un retraso significativo del crecimiento tumoral en este modelo tumoral agresivo *s.c.* (subcutáneo) utilizando un programa de dosificación estándar del anticuerpo q3 ó 4d en ratones, lo que indica así una actividad continua a lo largo del intervalo de dosificación. Además, los datos farmacocinéticos se establecen para la misma dosis.

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

Cálculo completo para A2:

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

Por lo tanto, para A2, la dosis semanal estimada para un ser humano de 70 kg está en el intervalo de 86 a 184 mg.

Utilizando las mismas asunciones descritas anteriormente, la dosis semanal humana estimada calculada para B2 para un ser humano de 70 kg es 189 a 404 mg.

Ejemplo 16

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

- 5 La expresión de CD37 en un panel de líneas celulares de mieloma múltiple se evalúa por análisis FACS utilizando anticuerpos específicos para CD37. Las células se incuban con un anticuerpo anti-CD37 marcado directamente con fluorescencia o con un anticuerpo específico de CD37 sin marcar seguido de un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia dirigido contra el anticuerpo primario. La actividad de fluorescencia de las células marcadas se mide con un Citómetro FACS Canto Flow (BD Biosciences) y la intensidad de la fluorescencia se registra como MFI
- 10 utilizando el Programa Informático FACS Diva. 6 de los 11 mielomas múltiples ensayados demuestran la expresión de CD37 en la superficie de las células (Figura 15). Una línea celular (RPMI 8226) se ensaya posteriormente en un ensayo ADCC como se describe en el Ejemplo 5 utilizando los anticuerpos específicos de CD37 A2 y B2. Los dos anticuerpos demuestran una actividad ADCC potente en células RPMI 8226 con valores CE_{50} en el intervalo de 25 ng/ml y una lisis celular máxima de aproximadamente 20% (Figura 16). Este ejemplo demuestra que las células de
- 15 mieloma múltiple CD37 positivas son susceptibles de lisis celular mediada por ADCC utilizando los mAb específicos de CD37 A2 y B2.

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

20 Ejemplo 17

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

- La actividad pro-apoptótica de A2 y B2 se evalúa en células de leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés) obtenidas de pacientes. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) se preparan a partir de un paciente con CLL diagnosticado, después de haber obtenido consentimiento informado
- 25 según la declaración de Helsinki. Las células CLL primarias se purifican a partir de sangre recién recogida de acuerdo con el procedimiento Ficoll-Paque® plus (StemCell Technologies, Meylan, Francia) y se almacenan a 4°C en medio de cultivo RPMI 1640 que contiene 10% de suero AB humano inactivado por calor (Sigma, Francia) hasta su uso. El medio de cultivo para células CLL primarias es RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina 2 mM y 10% de suero AB humano inactivado por calor. Para uso experimental, las células CLL primarias se cuentan en un
- 30 hemocitómetro y su viabilidad se evalúa por exclusión de azul tripán al 0,25%. La viabilidad de las muestras de CLL es más de 90%. Las células se incuban a 37°C durante 24 horas con los anticuerpos en 30 µg/ml y, posteriormente, el porcentaje de células positivas AnnexinV se determina como se describe en el Ejemplo 6. Como se muestra en la Figura 17, los anticuerpos A2 y B2 Fc-modificados presentan fuerte actividad pro-apoptótica sobre las células CLL primarias con aproximadamente 90% (A2) y 40% (B2) de células positivas AnnexinV. Ambos mAbs son claramente
- 35 superiores a rituximab, un anticuerpo específico de las células B aprobado para el tratamiento de la B-CLL. Mab A2 demuestra también actividad claramente superior en comparación con alemtuzumab, un anticuerpo aprobado para el tratamiento de CLL-B.

Ejemplo 18

- 40 Generación de un modelo de ratón transgénico, en el que el gen endógeno CD37 se reemplaza por su homólogo humano

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

Ejemplo 19

Generación de anticuerpos sustitutos

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

Ejemplo 19

Preparación de clones para producir anticuerpos

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

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

La línea celular de hámster CHO-DG44, crecida en suspensión en un medio definido químicamente, se co-transfecta con los vectores de expresión eucariotas para la cadena pesada y para la cadena ligera de los anticuerpos, como se ha descrito anteriormente. Las células transfectadas se seleccionan en medio sin hipoxantina ni timidina y en presencia del antibiótico G418. Posteriormente, las células se someten a una selección y amplificación por etapas utilizando concentraciones crecientes de metotrexato (MTX). A partir de la etapa de amplificación 800 nM MTX, se selecciona un único clón celular tomando como base el comportamiento del crecimiento y la producción de anticuerpo en ciclos de centrifugación y se conserva congelado en un Safety Cell Bank (SCB).

Referencias

American Cancer Society (Cancer Facts & Figures 2005).

Baker y Jones, Curr Opin in Drug Discovery & Development, 10, 219-227, 2007.

Barbas, et al., Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813, 1994.

Barrena et al., Leukemia 19: 1376-1383, 2005.

Belov et al., Cancer Research 61: 4483-4489, 2001.

Boulianne G. L., Hozumi N. y Shulman, M. J., Production of functional chimeric mouse/human antibody. Nature 312: 643, 1984.

Brockhoff G, Hofstaedter F, Knuechel R., Cytometry 1994, 17(1):75-83.

Buchsbaum et al., Cancer Research 52: 6476-6481, 1992.

Chothia y Lesk., J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987.

Coiffier B, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. Blood 1998; 92: 1927-1932.

Coiffier, JCO, 23, 6387-93, 2005.

Edelman et al. Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85, 1969.

Feugier P, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol 2005; 23: 4117-4126.

- Foran JM, et al. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 317-324.
- 5 Forstpointner R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*, 2004; 104: 3064-3071.
- Francisco et al., *Blood*, 2003 Aug 15;102(4):1458-65.
- Frank, et al., *Methods Enzymol.* 154: 221-249, 1987.
- 10 Gait, M.J., *Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach.* IRL Press, Oxford, UK (1984).
- Goldenberg DM y Sharkey RM, *Oncogene* (2007) 26, 3734–3744. Novel radiolabeled antibody conjugates.
- Hainsworth JD. Prolonging remission with rituximab maintenance therapy. *Semin Oncol* 2004; 31: 17-21.
- Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 254:889-896, 1992.
- Hayden y Mandecki. Gene synthesis by serial cloning of oligonucleotides. *DNA* 7(8): 571-7, 1988.
- 15 Hertz T, Yanover C: PepDist: A new framework for protein-peptide binding prediction based on learning peptide distance functions. *BMC Bioinform* (2006) 7 (Supl 1):S3-S17.
- Hiddemann W, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study. Group. *Blood* 2005; 106: 3725-3732 (2005a).
- 20 Hiddemann W, et al. Treatment strategies in follicular lymphomas: current status and future perspectives. *J Clin Oncol* 2005b; 23: 6394-6399.
- Howard OM, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1288-1294.
- 25 Ichimura et al., *J. Antibiot. (Tokio)*, 44, 1045-53, 1991.
- Jackson et al., 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9.
- Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 203: 88-98, 1991.
- 30 Jones TD, Hanlon M, Smith BJ, Heise CT, Nayee PD, Sanders DA, Hamilton A, Sweet C, Unitt E, Alexander G, Lo KM et al: The development of a modified human IFN- α 2b linked to the Fc portion of human IgG1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection. *J Interferon Cytokine Res* (2004) 24(9):560-572.
- Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP: Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of Factor VIII. *J Thromb Haemost* (2005) 3(5): 991-1000.
- 35 Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. y Foeller C. *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5a Ed.). N° de publicación NIH 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991.
- Kahl B, et al. Maintenance rituximab following induction chemoimmunotherapy may prolong progression-free survival in mantle cell lymphoma: a pilot study from the Wisconsin Oncology Network. *Ann Oncol*, 2006; 17: 1418-1423.
- 40 Kaminski et al., *JCO* 10: 1696-1711, 1992.
- Kipriyanow y Le Gall, *Molecular Biotechnology* 26: 39- 60, 2004.
- Knobeloch et al., *MolCellBiol* 20: 5363-5369, 2000.
- van der Kolk LE, Baars JW, Prins MH, van Oers MH. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. *Blood*, 2002, Sept 15;100(6):2257-9.
- 45 McLaughlin P, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2825-2833.

- Lazar et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4005-10, 2006.
- Ling y MacLennan, pp. 302-335 in Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, 1987.
- Link et al., Journal Immunol 137: 3013-3018, 1986.
- 5 Lobo et al., J Pharm Sci 2004;93(11):2645-2668.
- Lowman et al., Biochemistry 30(45): 10832-10837, 1991.
- Marks et al., Biotechnology 10:779-783, 1992.
- Moldenhauer G., et al., 1987. Biochemical characterization and epitope analysis of B lymphocyte-specific surface antigens defined by clustering workshop monoclonal antibodies. En Leukocyte Typing 111. A. McMichael. ed. Oxford University Press, Oxford. p. 378.
- 10 Moldenhauer G.: CD37. J. Biol Regul Homeost Agents 2000; 14: 281-83.
- Press et al., JCO 7, 1989.
- Press OW, et al. Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. N Engl J Med 1993; 329: 1219-1224.
- 15 Reche PA, Glutting JP, Zhang H, Reinherz EL: Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. Immunogenetics (2004), 56(6):405-419.
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21 edición, Hendrickson R. Ed.
- Romaguera JE, et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. J Clin Oncol, 2005; 23: 7013-7023.
- 20 Sasse et al., J. Antibiot. (Tokio), 53, 879-85, 2000.
- Shier et al., 1995, Gene 169:147-155.
- Schwartz-Albiez et al, Journal Immunol 140: 905-914, 1988.
- Stemmer et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides, Gene 164(1): 49-53, 1995.
- 25 van Spriel et al., Journal Immunol 172: 2953-2961, 2004.
- Suzawa et al., Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84, 2000.
- Tangri S, Mothe BR, Eisenbraun J, Sidney J, Southwood S, Briggs K, Zinckgraf J, Bilsel P, Newman M, Chesnut R, LiCalsi C, Sette A: Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. J Immunol (2005) 174(6):3187-3196.
- 30 Thomas DA, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. Cancer 2006; 106: 1569-1580.
- Ye et al. Gene synthesis and expression in E. coli for pump, a human matrix metalloproteinase. Biochem Biophys Res Commun 186(1):143-9, 1992.
- 35 Yelton et al., 1995, Immunol. 155:1994-2004.
- Zhao et al., Blood 104: Resumen 2515, 2004.
- Zhao XB, Lapalombella R, Joshi T, Cheney C, Gowda A, Hayden-Ledbetter MS, Baum PR, Lin TS, Jarjoura D, Lehman A, Kussewitt D, Lee RJ, Caligiuri MA, Tridandapani S, Muthusamy N, Byrd JC. Targeting CD37+ lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical 2007; BLOOD, 1 OCTUBRE 2007, VOLUMEN 110, NÚMERO 7 (Epub antes de la impresión. Blood. 2007 Abr 17)
- 40

Listado de secuencias

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Anticuerpos anti-CD37

<130> 12_0278_PCT

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(348)

<400> 1

gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct	48
Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr	
20 25 30	
aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att	144
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc	192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt	288
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc	336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val	
100 105 110	
acc gtc tct tct	348
Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

ES 2 555 202 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

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

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(329)

<400> 3

gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat 96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg 288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga 324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

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

ES 2 555 202 T3

<400> 4

```

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

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

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

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

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

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

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

```

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

10 <220>
 <223> Secuencia de inmunoglobulina murina humanizada

<220>
 <221> CDS

15 <222> (1)..(348)

<400> 5

```

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

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

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

```

20

ES 2 555 202 T3

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

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

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

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

acc gtc tct tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

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

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

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

<220>
 <223> Secuencia de inmunoglobulina murina humanizada

ES 2 555 202 T3

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

5 <400> 7

```

gcc gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc ggc      48
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

agc ctg aga ctg agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
          20          25          30

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

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

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

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

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

acc gtc tct tca      348
Thr Val Ser Ser
          115
  
```

10 <210> 8
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 8

```

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

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

20

ES 2 555 202 T3

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

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

<220>
<223> Secuencia de inmunoglobulina murina humanizada

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

<400> 9

gcc gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc ggc 48
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

agc ctg aga ctg agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

gcc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag gtc 192
Ala Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Val
50 55 60

aag ggc agg ttc acc atc agc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

acc gtc tct tca 348
Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 116

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 11
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia de inmunoglobulina murina humanizada

20 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 11

gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
25 1 5 10 15

ES 2 555 202 T3

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de inmunoglobulina murina humanizada

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 13

5

```

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 14

10

15

```

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

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

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

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

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

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

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

```

20

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

ES 2 555 202 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de inmunoglobulina murina humanizada

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18

<211> 108

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética

5

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

10

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

15

<220>
 <223> Secuencia de inmunoglobulina murina humanizada

<220>
 <221> CDS

20

<222> (1)..(324)

<400> 19

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

25

48

ES 2 555 202 T3

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de inmunoglobulina murina humanizada

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 21

5

```

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 22

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 22

10

15

```

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

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

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

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

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

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

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

```

20

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

5

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

10

<400> 23

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

ES 2 555 202 T3

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

<210> 24

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

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

10

ES 2 555 202 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 25

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

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

5

<400> 25

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

10 <210> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 26

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

20 <210> 27

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

5 <220>
<223> Secuencia de inmunoglobulina quimérica Fc-modificada

<220>
<221> CDS

10 <222> (1)..(1338)

<400> 27

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

15

ES 2 555 202 T3

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

ES 2 555 202 T3

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

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

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

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

<210> 28

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 555 202 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>

<223> Secuencia de inmunoglobulina quimérica

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(642)

<400> 29

gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat	96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr	
20 25 30	
ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val	
35 40 45	
tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc	192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg	288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp	
85 90 95	
acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca	336
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105 110	
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga	384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
115 120 125	
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc	432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130 135 140	
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag	480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
145 150 155 160	
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc	528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
165 170 175	
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac	576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
180 185 190	
gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc	624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
195 200 205	
ttc aac agg gga gag tgt	642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210	

<210> 30

<211> 214

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 30

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31

10 <211> 1338

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de inmunoglobulina quimérica Fc-modificada

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1338)

ES 2 555 202 T3

<400> 31

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

ES 2 555 202 T3

130	135	140	
gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tgg aac tca ggc Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 145 150 155 160			480
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 165 170 175			528
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190			576
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205			624
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220			672
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg gcg gga ccg gat gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240			720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255			768
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270			816
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285			864
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300			912
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320			960
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335			1008
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350			1056
tcc ccg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365			1104
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380			1152
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385 390 395 400			1200
ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 405 410 415			1248
cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 420 425 430			1296
aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440 445			1338

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

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 32

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 555 202 T3

165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe		
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
340	345	350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445

<210> 33

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de inmunoglobulina quimérica

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

5 <400> 33

gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat	96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr	
20 25 30	
ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val	
35 40 45	
tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc	192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg	288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp	
85 90 95	
acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca	336
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105 110	
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga	384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
115 120 125	
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc	432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130 135 140	
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag	480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
145 150 155 160	
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc	528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
165 170 175	
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac	576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
180 185 190	
gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc	624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
195 200 205	
ttc aac agg gga gag tgt	642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210	

10 <210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Construcción sintética

ES 2 555 202 T3

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

5

<210> 35

<211> 1338

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de inmunoglobulina humanizada Fc-modificada

<220>

15

<221> CDS

<222> (1)..(1338)

<400> 35

ES 2 555 202 T3

gcg gtc cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser 1 5 10 15	48
agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr 20 25 30	96
aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45	144
ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe 50 55 60	192
aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val 100 105 110	336
acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala 115 120 125	384
ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu 130 135 140	432

ES 2 555 202 T3

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 145 150 155 160	480
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 165 170 175	528
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190	576
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205	624
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220	672
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg gac gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240	720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255	768
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270	816
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285	864
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300	912
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320	960
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335	1008
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350	1056
tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365	1104
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380	1152
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385 390 395 400	1200
ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 405 410 415	1248
cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 420 425 430	1296
aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440 445	1338

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

5

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 36

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 555 202 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de inmunoglobulina humanizada

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(642)

<400> 37

10

gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr	
20 25 30	
ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val	
35 40 45	
tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc	192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp	
85 90 95	
acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca	336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105 110	
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga	384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
115 120 125	
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc	432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130 135 140	
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag	480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
145 150 155 160	
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc	528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
165 170 175	
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac	576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
180 185 190	
gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc	624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
195 200 205	
ttc aac agg gga gag tgt	642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210	

<210> 38

15

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 38

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 39

10 <211> 1338

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de inmunoglobulina humanizada Fc-modificada

<220>

ES 2 555 202 T3

<221> CDS

<222> (1)..(1338)

<400> 39

5

gcg gtc cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc	48
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
1 5 10 15	
agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr	
20 25 30	
aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg	144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc	192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac	240
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc	336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
100 105 110	
acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca	384
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala	
115 120 125	
ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg	432
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu	
130 135 140	

ES 2 555 202 T3

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 145 150 155 160	480
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 165 170 175	528
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190	576
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205	624
aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220	672
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg gcg gga ccg gat gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240	720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255	768
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270	816
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285	864
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300	912
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320	960
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335	1008
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350	1056
tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365	1104
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380	1152
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385 390 395 400	1200
ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 405 410 415	1248
cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 420 425 430	1296
aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440 445	1338

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

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 40

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 555 202 T3

165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu 180 185 190		
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205		
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr 210 215 220		
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe 225 230 235 240		
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255		
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270		
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285		
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290 295 300		
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320		
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335		
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350		
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365		
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380		
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385 390 395 400		
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 405 410 415		
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 420 425 430		
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440 445		

<210> 41

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de inmunoglobulina humanizada

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

5 <400> 41

gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr	
20 25 30	
ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val	
35 40 45	
tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc	192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp	
85 90 95	
acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca	336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105 110	
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga	384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
115 120 125	
act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc	432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130 135 140	
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag	480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Ser Gly Asn Ser Gln	
145 150 155 160	
gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc	528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
165 170 175	
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac	576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
180 185 190	
gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc	624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
195 200 205	
ttc aac agg gga gag tgt	642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210	

10 <210> 42
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Construcción sintética

ES 2 555 202 T3

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo quimérico que se une a CD37 humano y que está definida por
 - i) una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2,
 - 5 ii) una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4,
 - iii) cadenas pesadas y ligeras constantes que son de origen humano.
2. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, en la que
 - i) la cadena pesada constante es una cadena IgG1, y
 - 10 ii) la cadena ligera constante es una cadena kappa.
3. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1 o 6, en la que dicha molécula de anticuerpo tiene una o más mutaciones en el dominio Fc que modulan una o más funciones efectoras. preferiblemente en la que dicha modulación de la función efectora es un incremento en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.
- 15 4. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 3, en la que dicha una o más mutaciones en el dominio Fc es una combinación de sustituciones en las posiciones 239 y 332, o 236 y 332, o 236, 239 y 332, numeradas según el índice de numeración Kabat de EU, preferiblemente dichas sustituciones son I332E y S239D o I332E y G236A, o S239D, I332E y G236A.
- 20 5. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30.
6. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34.
- 25 7. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
8. Un anticuerpo que se une a CD37 humano y tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30.
- 30 9. Un anticuerpo que se une a CD37 humano y tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34.
10. Un anticuerpo que se une a CD37 humano y tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
- 35 11. Una molécula de ADN que comprende una región que codifica la cadena pesada variable de un anticuerpo según la reivindicación 1 a 10 y una región que codifica la cadena ligera variable de un anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 10.
- 40 12. La molécula de ADN de la reivindicación 11, en la que dicha región codificadora de la cadena pesada variable está fusionada con una región que codifica una cadena pesada constante de origen humano, preferiblemente dicha cadena pesada constante de origen humano es IgG1 y preferiblemente dicha cadena pesada constante de origen humano tiene una o más sustituciones en la región Fc.
13. La molécula de ADN de la reivindicación 12, en la que dicha IgG1 está codificada por una secuencia mostrada en SEQ ID NO:27 o en SEQ ID NO: 31 o en SEQ ID NO: 23.
- 45 14. La molécula de ADN de la reivindicación 11, en la que dicha región codificadora de la cadena ligera variable está fusionada con una región que codifica una cadena ligera constante de origen humano, preferiblemente dicha cadena ligera constante es una cadena kappa.
15. La molécula de ADN de la reivindicación 14, en la que dicha cadena ligera kappa está codificada por una secuencia mostrada en SEQ ID NO:29 o en SEQ ID NO: 23 o en SEQ ID NO: 25.
- 50

16. Un vector de expresión que comprende una molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, preferiblemente el vector comprende la molécula de ADN de la reivindicación 13 y/o la molécula de ADN de la reivindicación 15.
17. Una célula anfitriona que contiene uno o más vectores de la reivindicación 16.
- 5 18. Un método para producir un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende transfectar una célula anfitriona de mamífero con uno o más vectores de la reivindicación 16, cultivar la célula anfitriona y purificar la molécula de anticuerpo.
19. Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, una o más moléculas de anticuerpo anti-CD37 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo aceptable farmacéuticamente.
- 10 20. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, que comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales.
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en la que dichos uno o más agentes terapéuticos adicionales son agentes dirigidos al antígeno CD20 de las células B.
- 15 22. La composición farmacéutica de una de las reivindicaciones 19 a 21 para uso en suprimir células B que expresan CD37 sobre su superficie.
23. La composición farmacéutica de una de las reivindicaciones 19 a 21 para uso en curar neoplasias de células B o enfermedades autoinmunes o inflamatorias en cuya patología están implicadas las células B, preferiblemente dicha neoplasia de células B se selecciona de linfoma no Hodgkins de células B, leucemia linfocítica crónica de células B y mieloma múltiple.
- 20 24. Un método de supresión de células B que expresan CD37 a partir de una población de células, que comprende administrar a dicha población de células una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una composición farmacéutica que contiene dicha molécula de anticuerpo, en donde dicho método se lleva a cabo *in vitro*.
- 25

Fig. 1

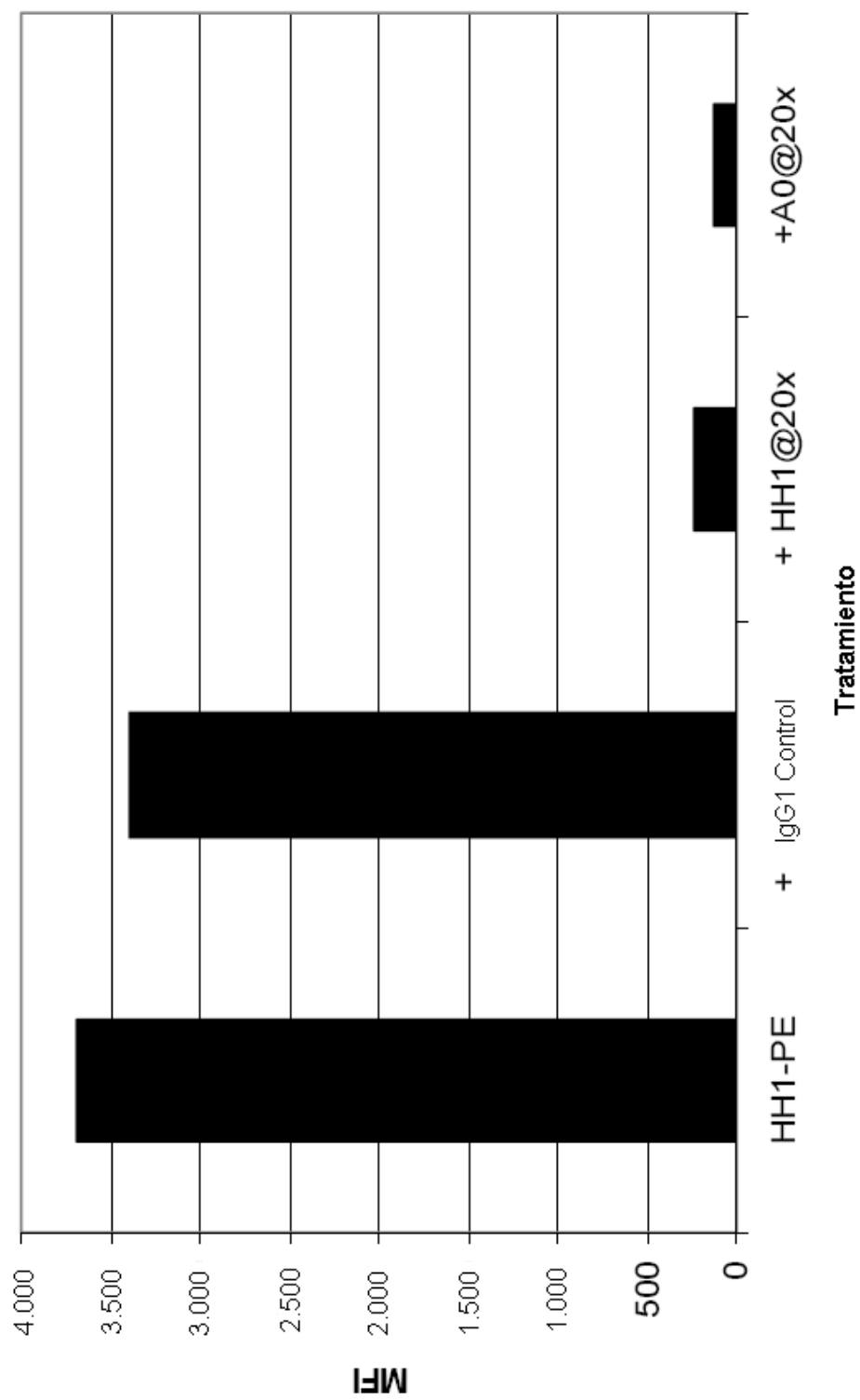


Fig. 2

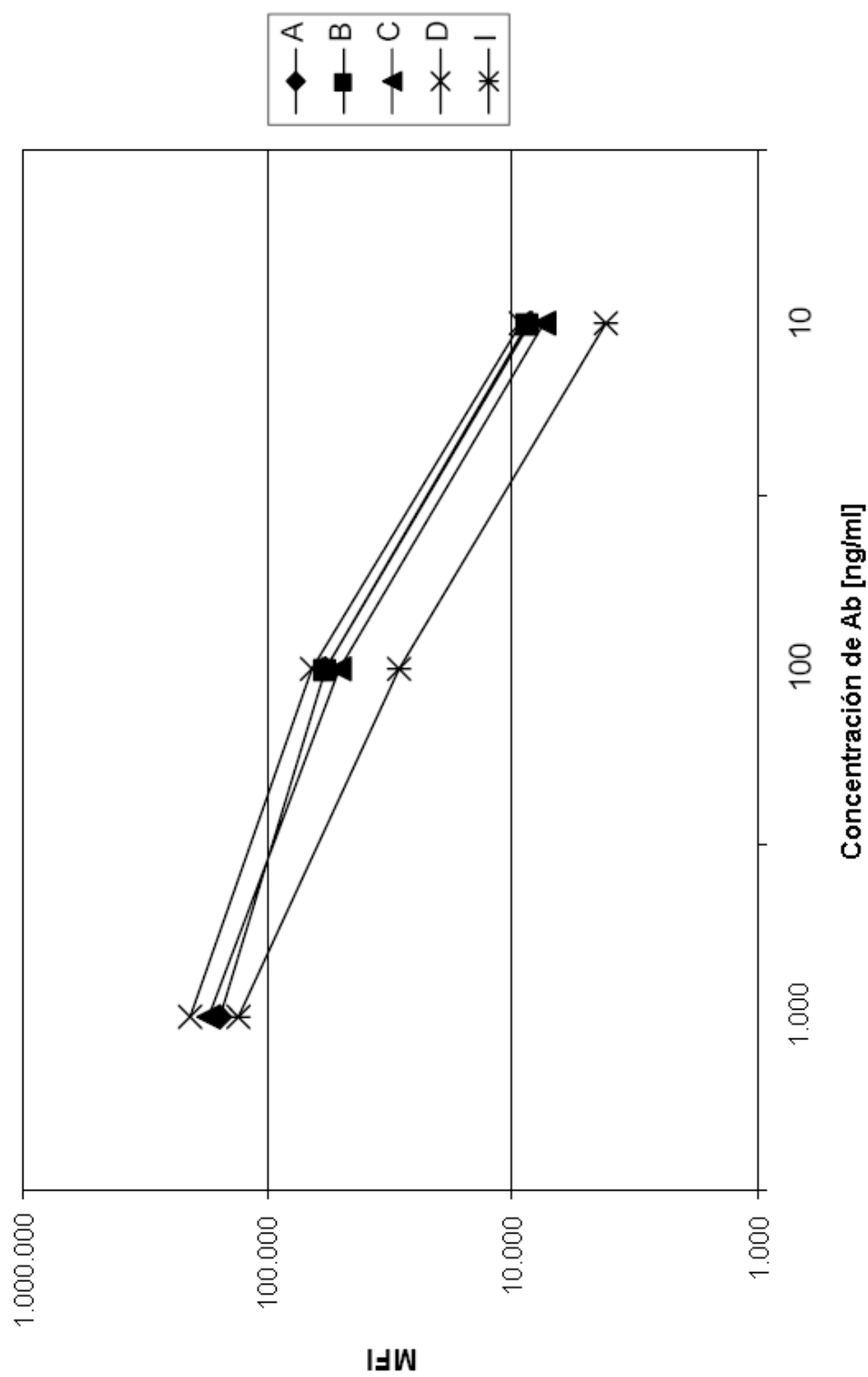


Fig. 3

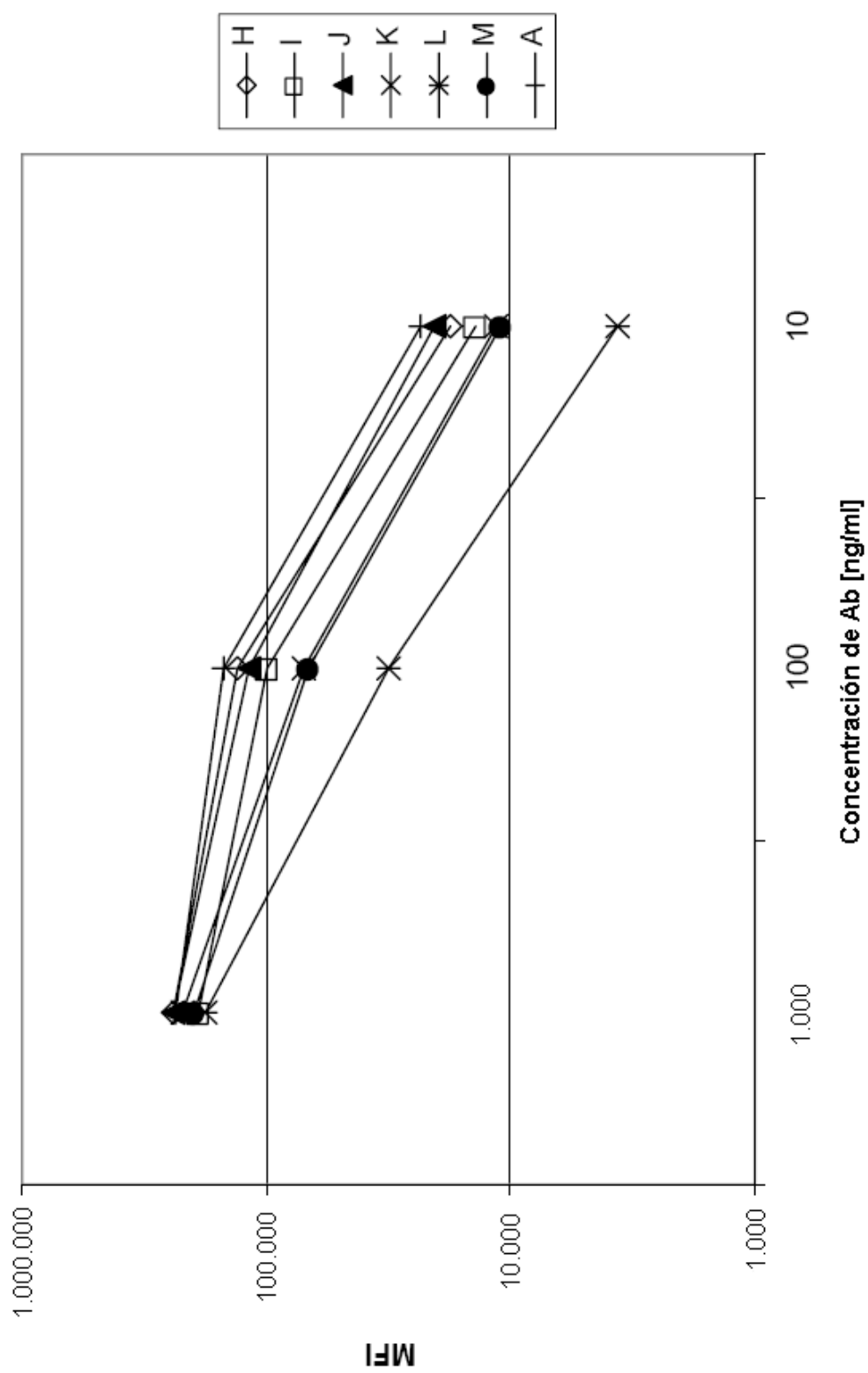


Fig. 4

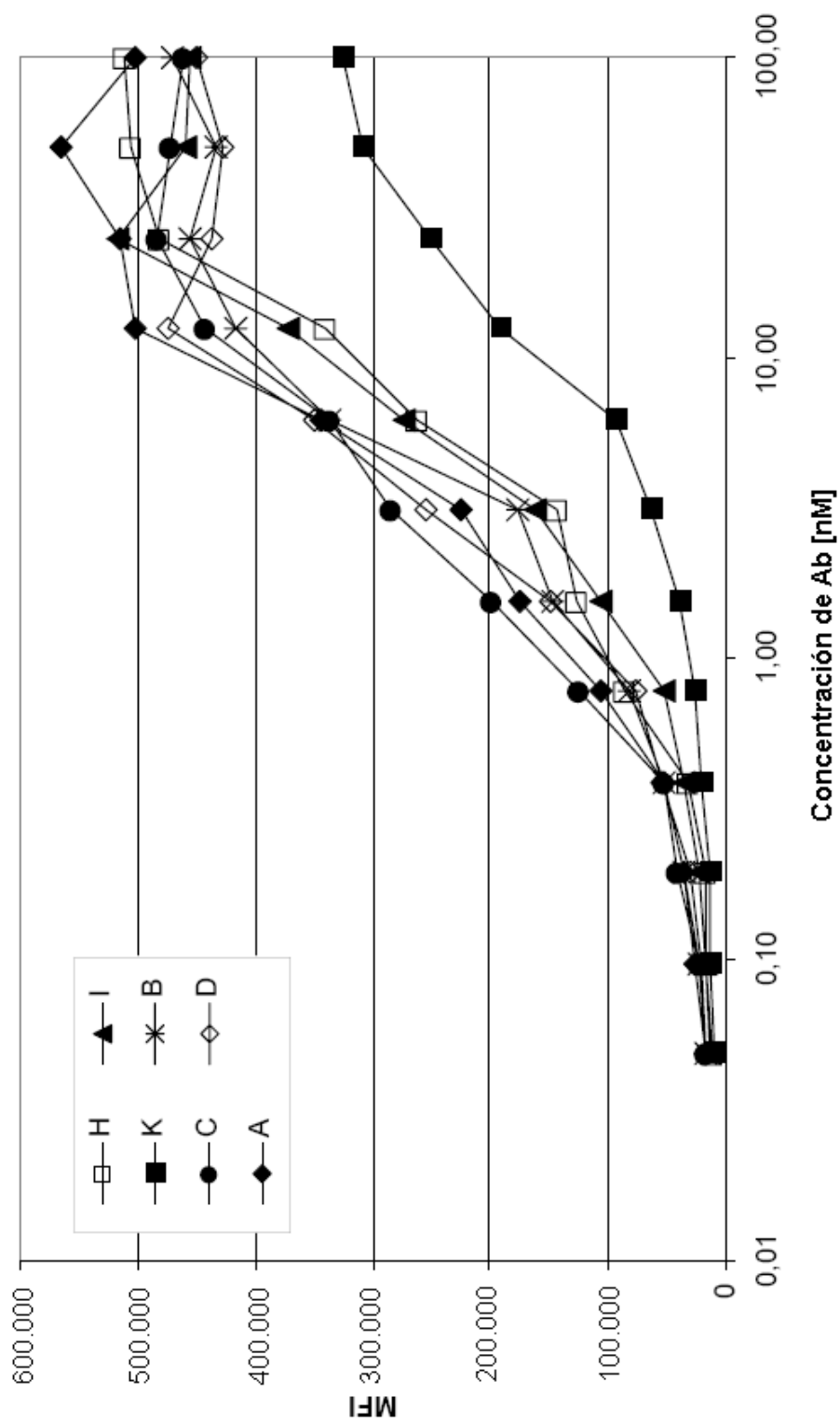


Fig. 5

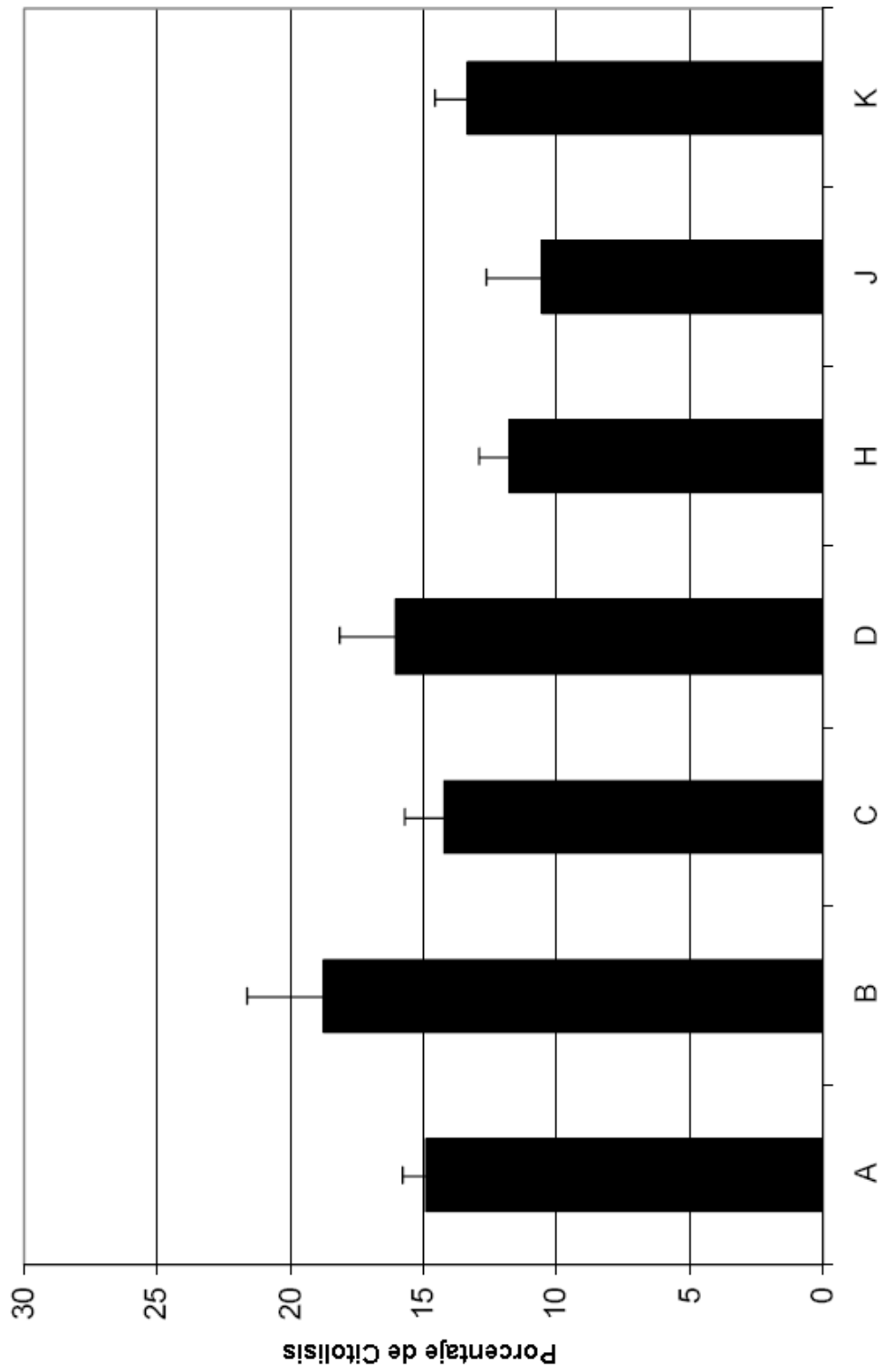


Fig. 6

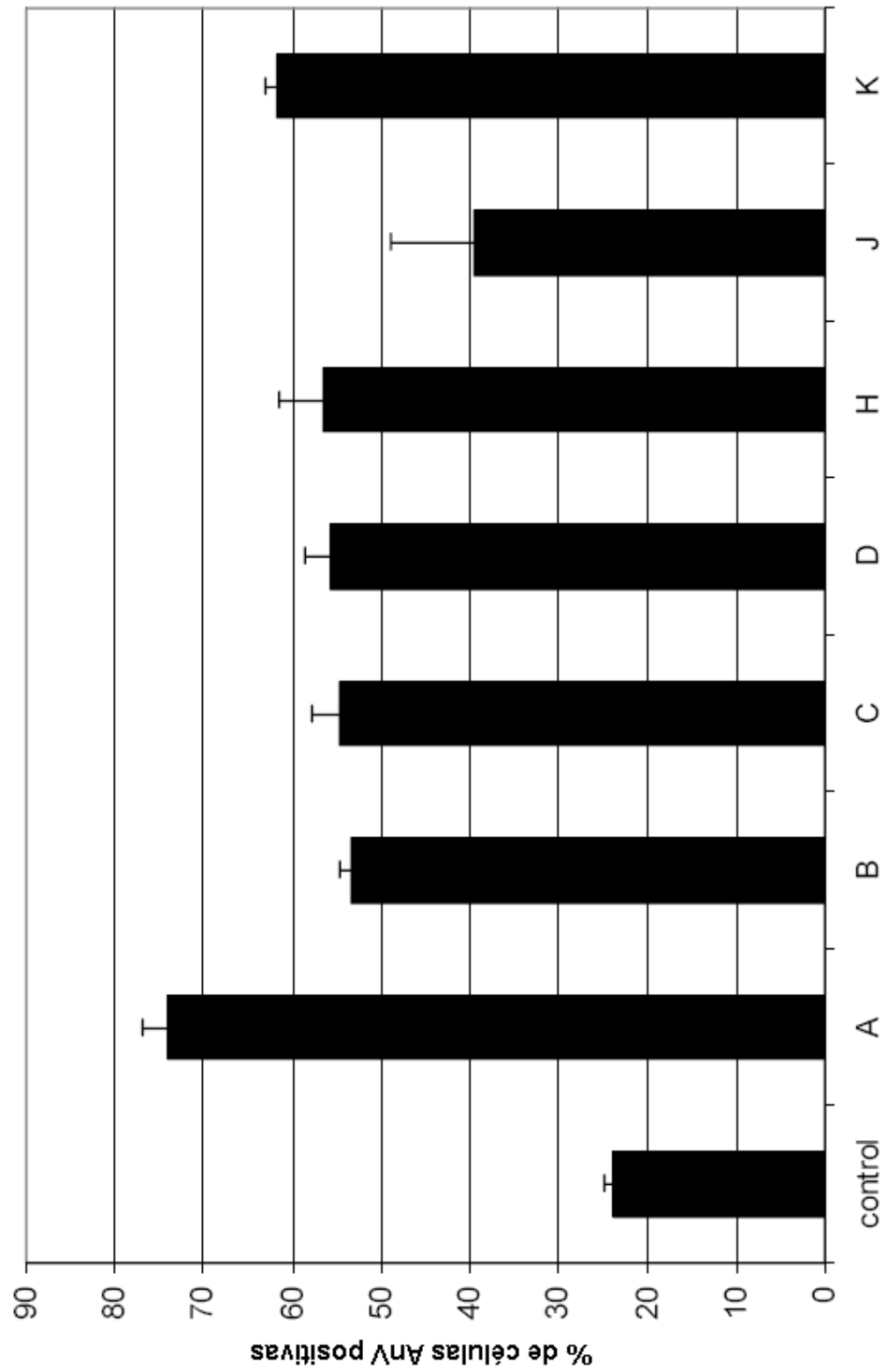


Fig. 7

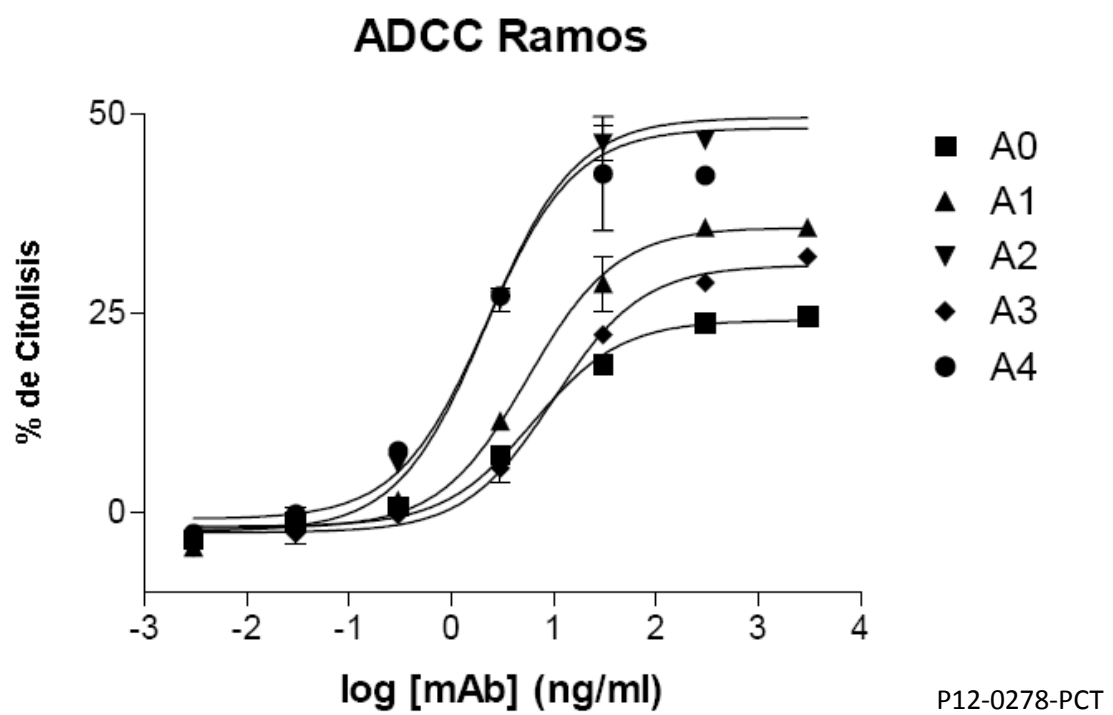


Fig. 8

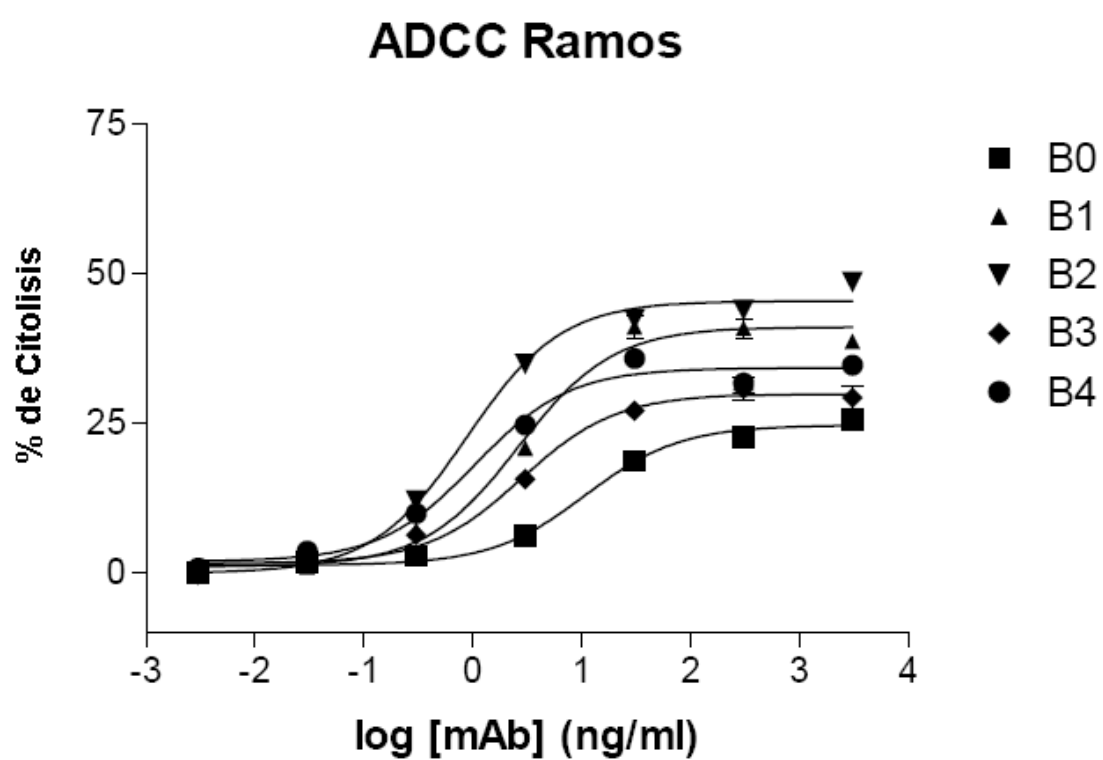


Fig. 9

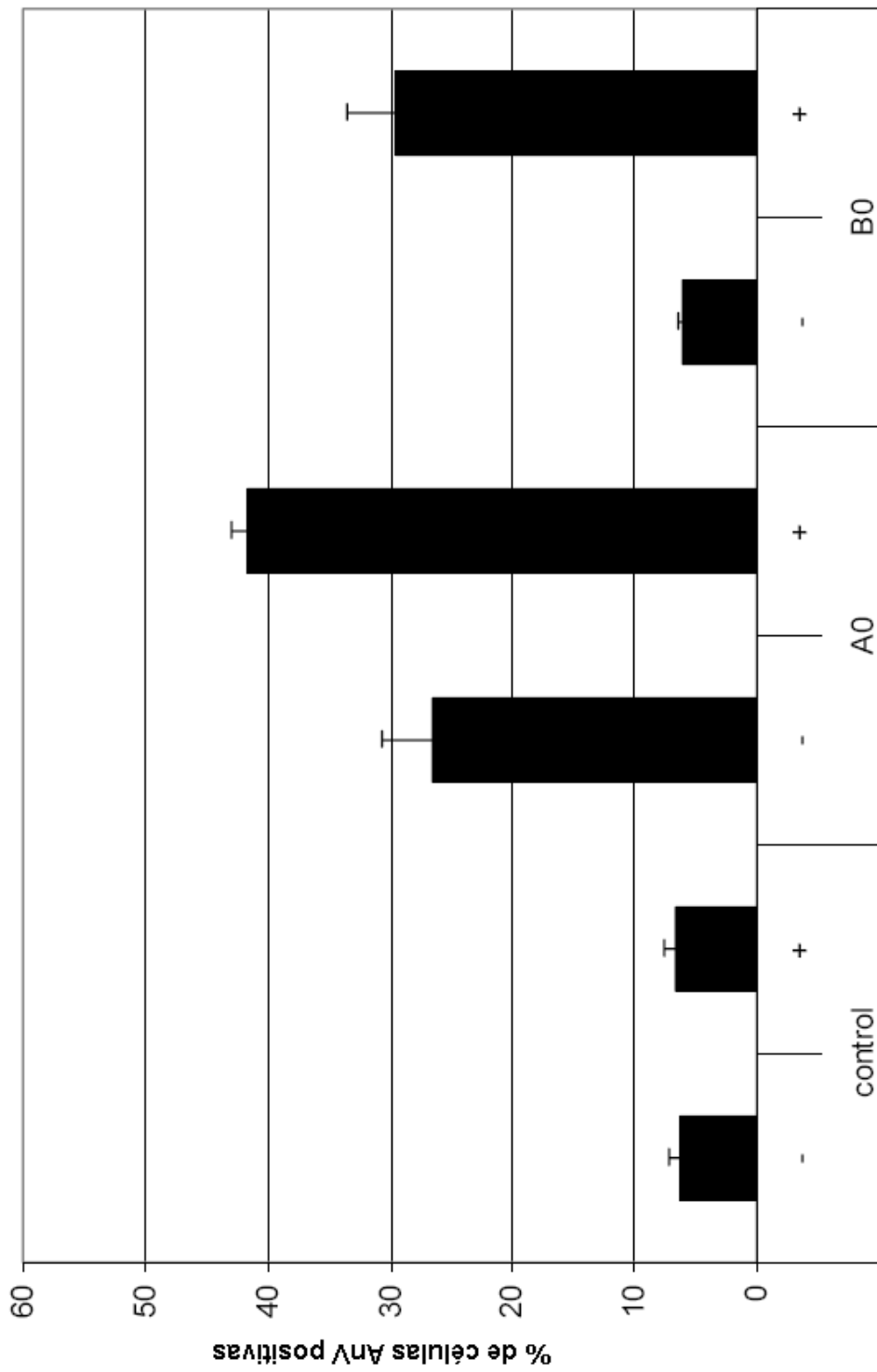


Fig. 10

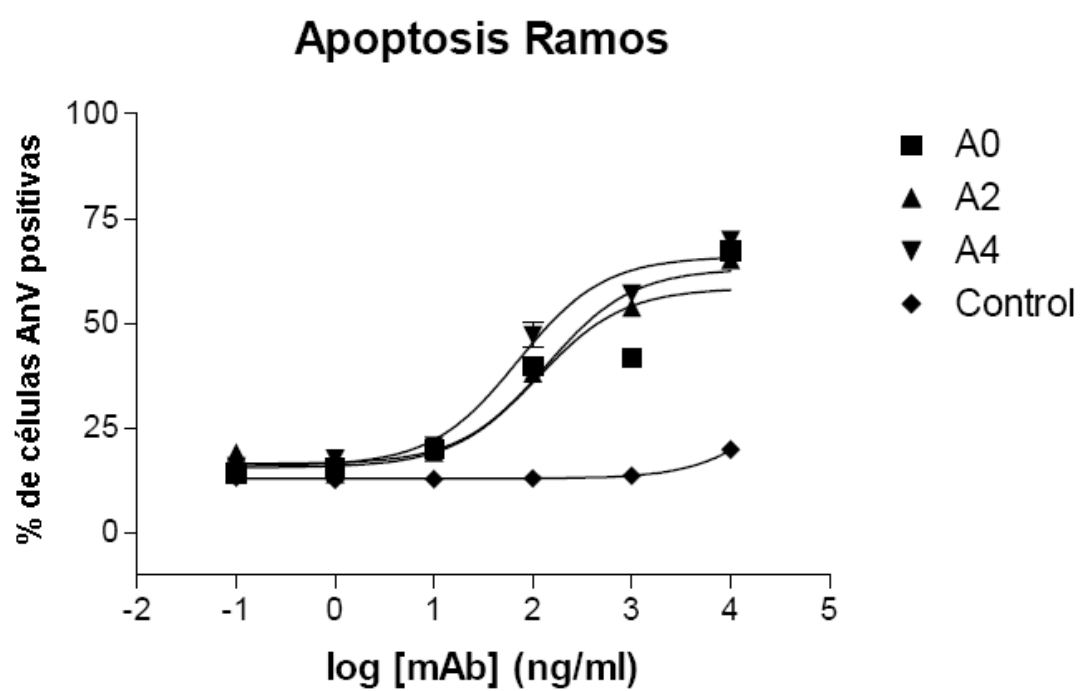


Fig. 11A

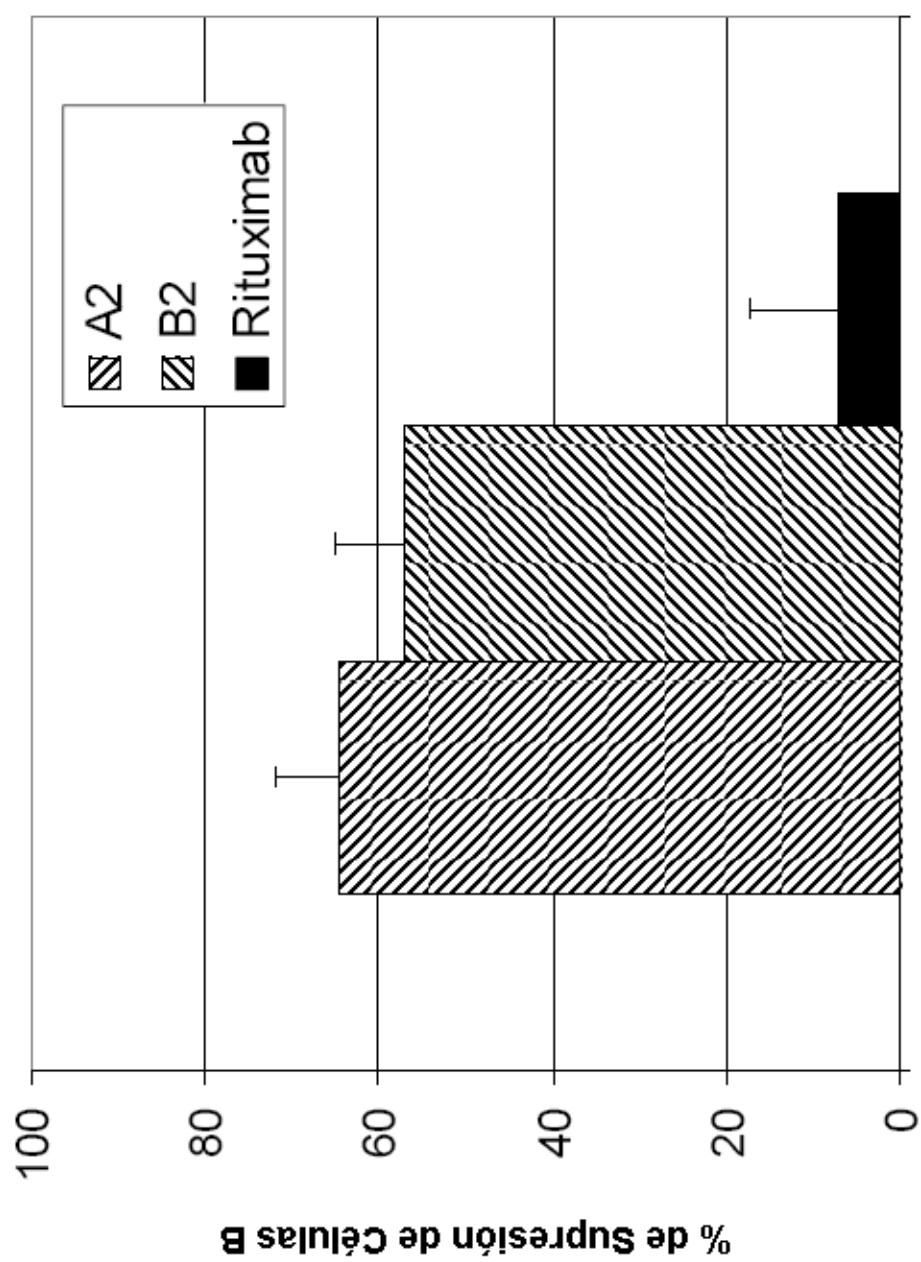


Fig. 11B

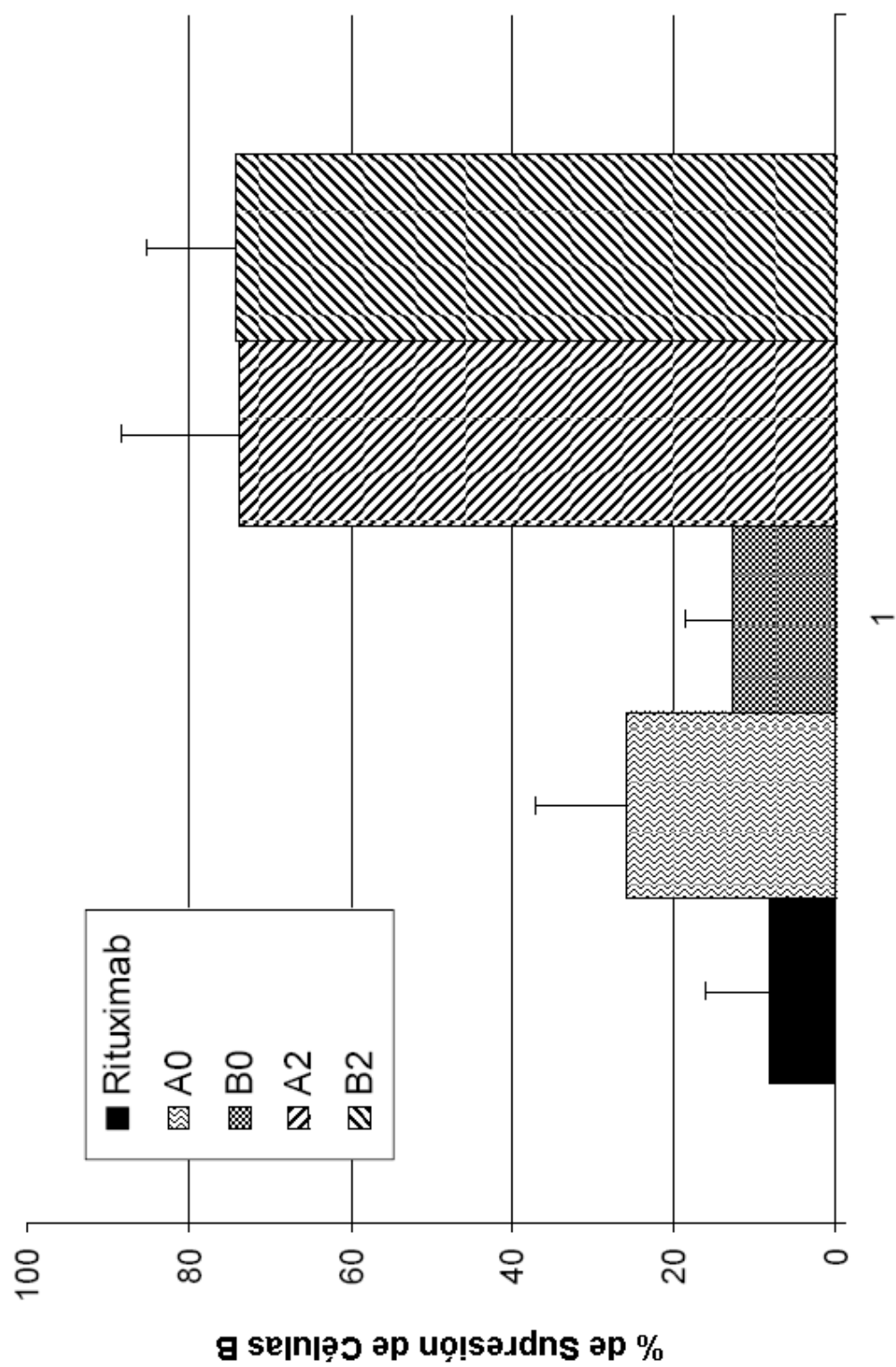


Fig. 11C

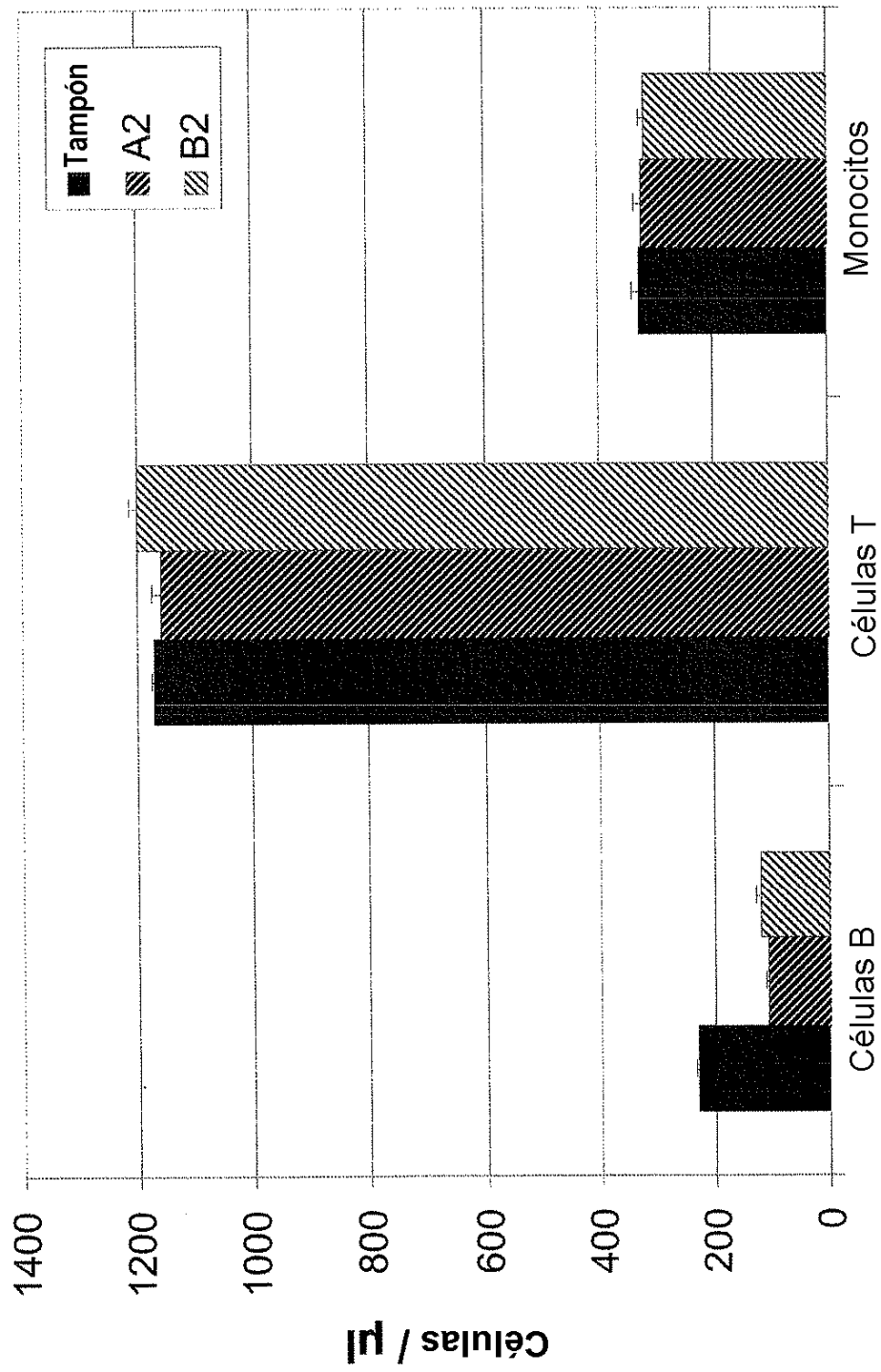


Fig. 12

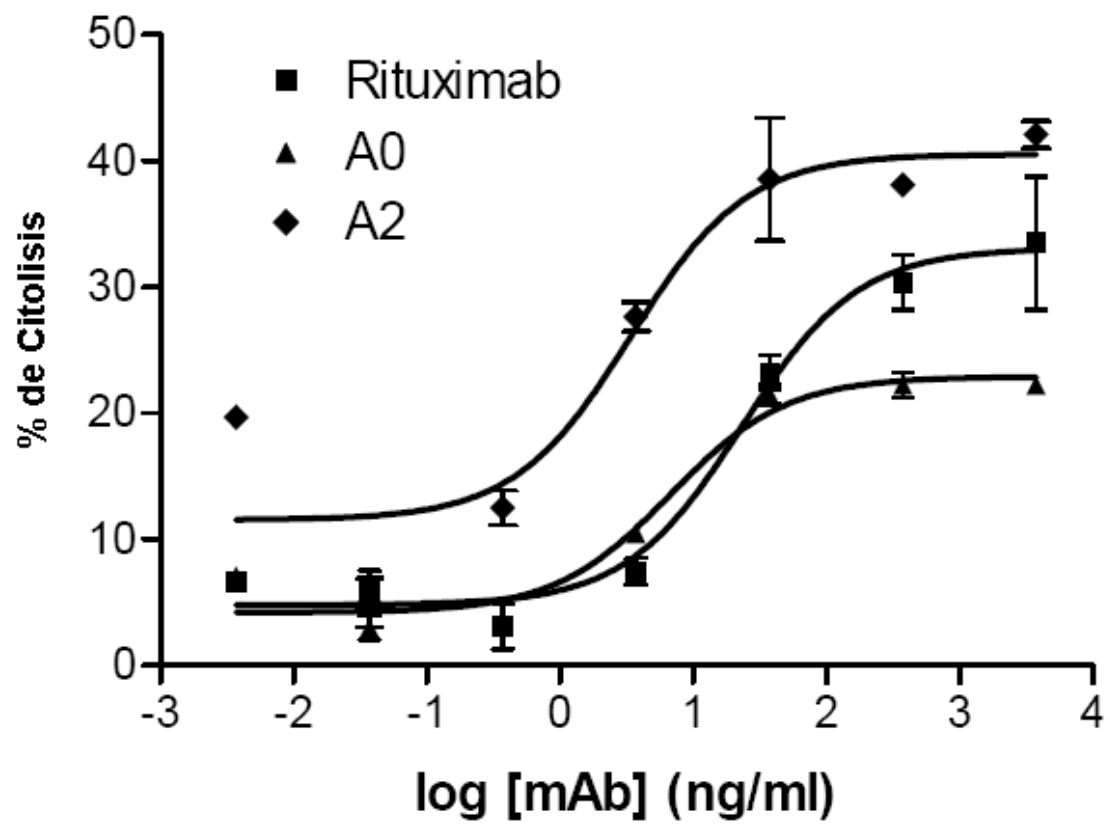


Fig. 13

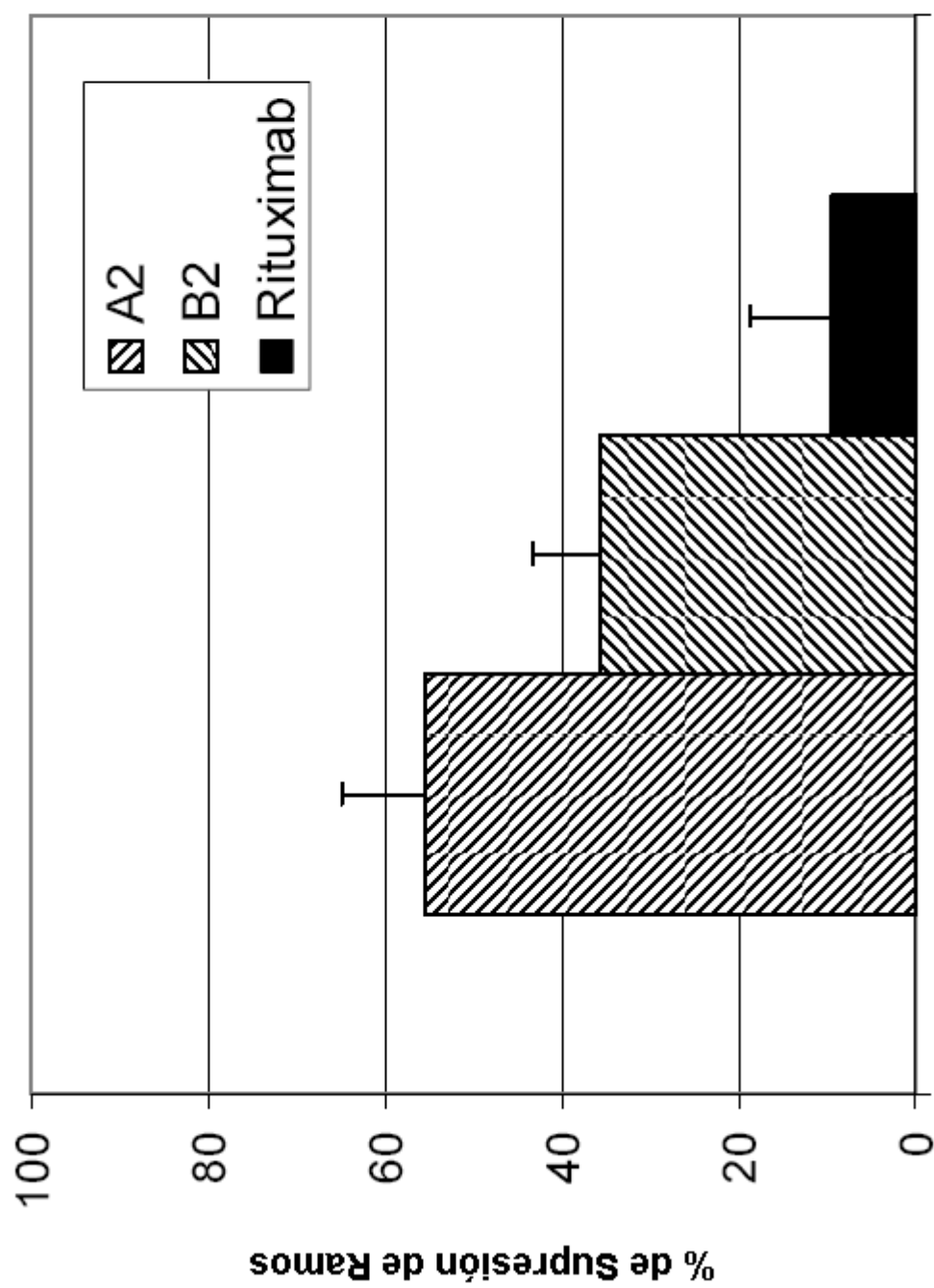


Fig. 14

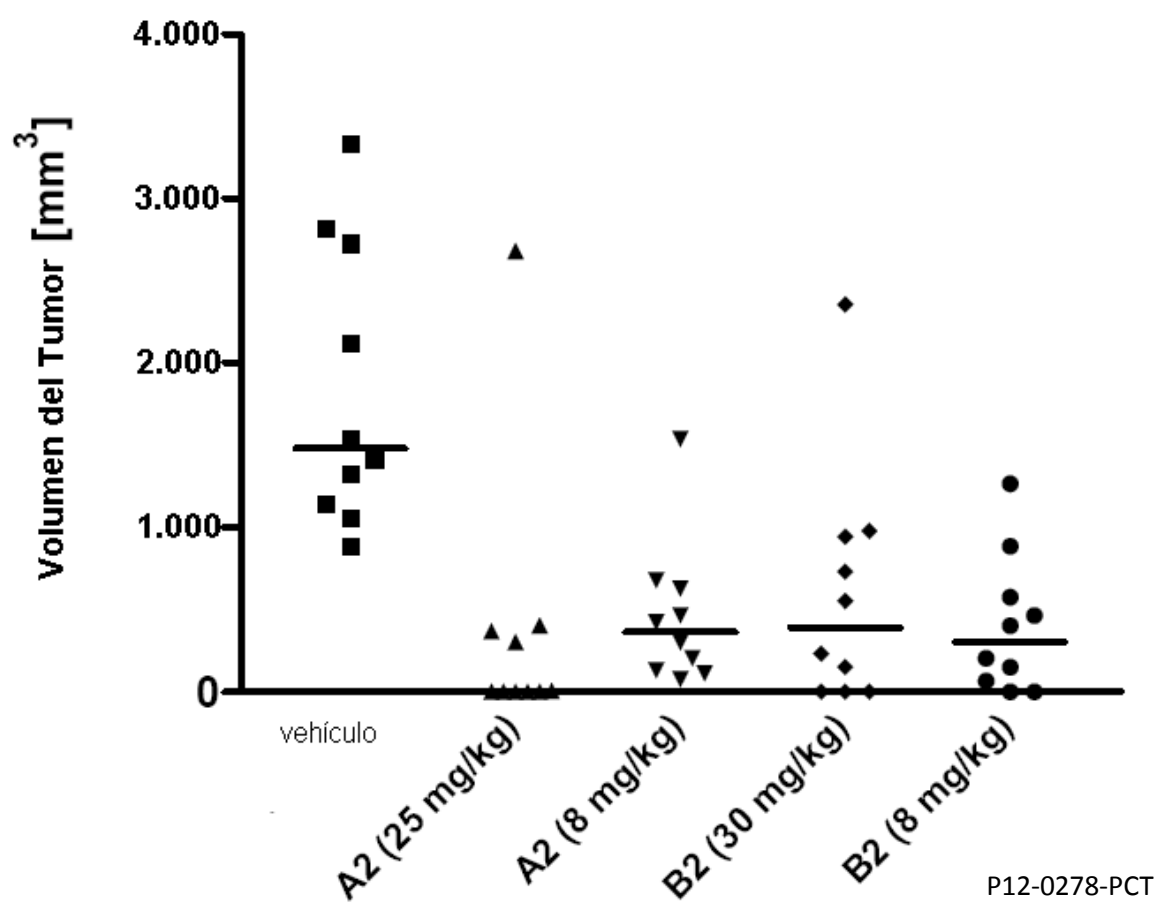


Fig. 15

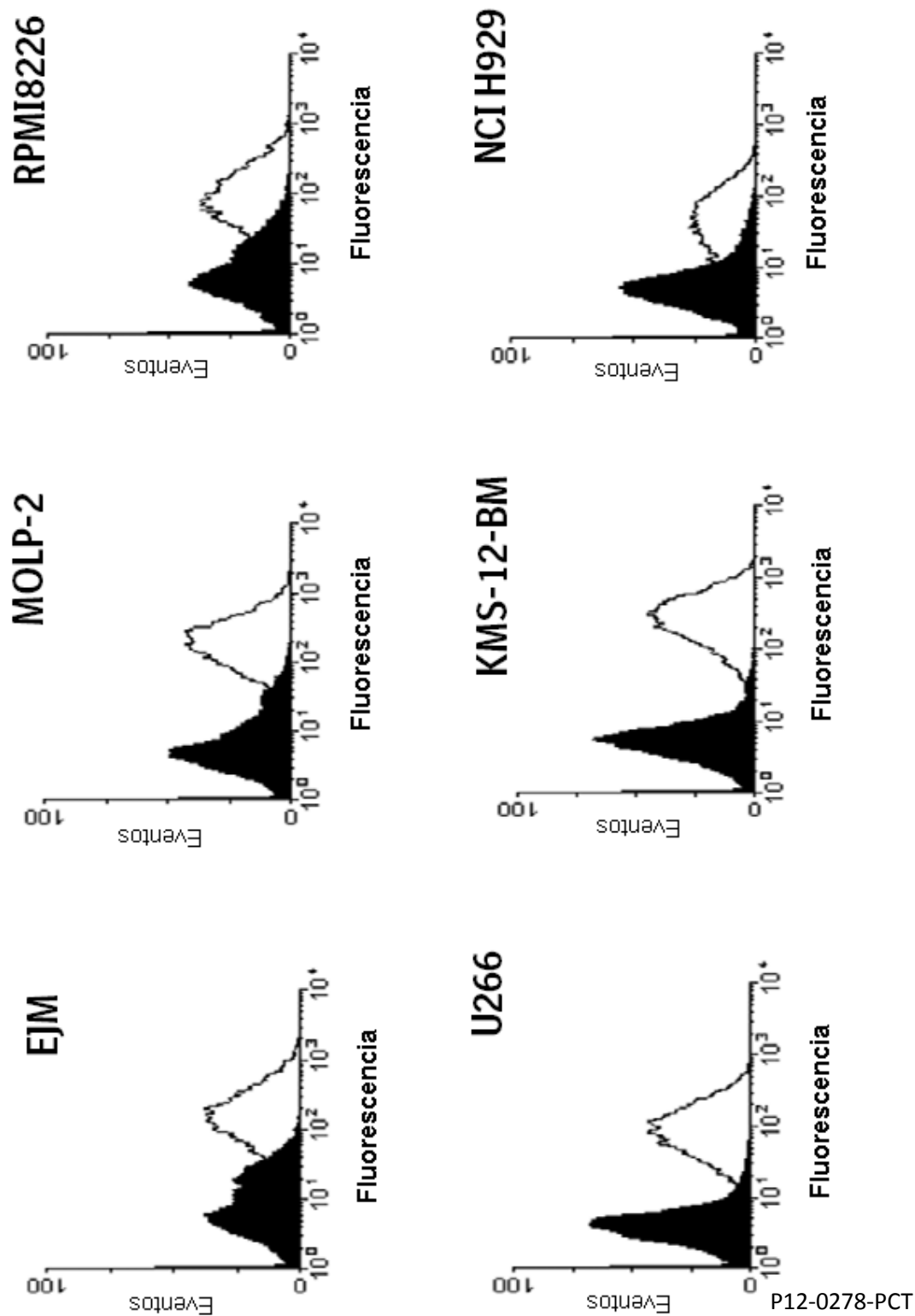


Fig. 16

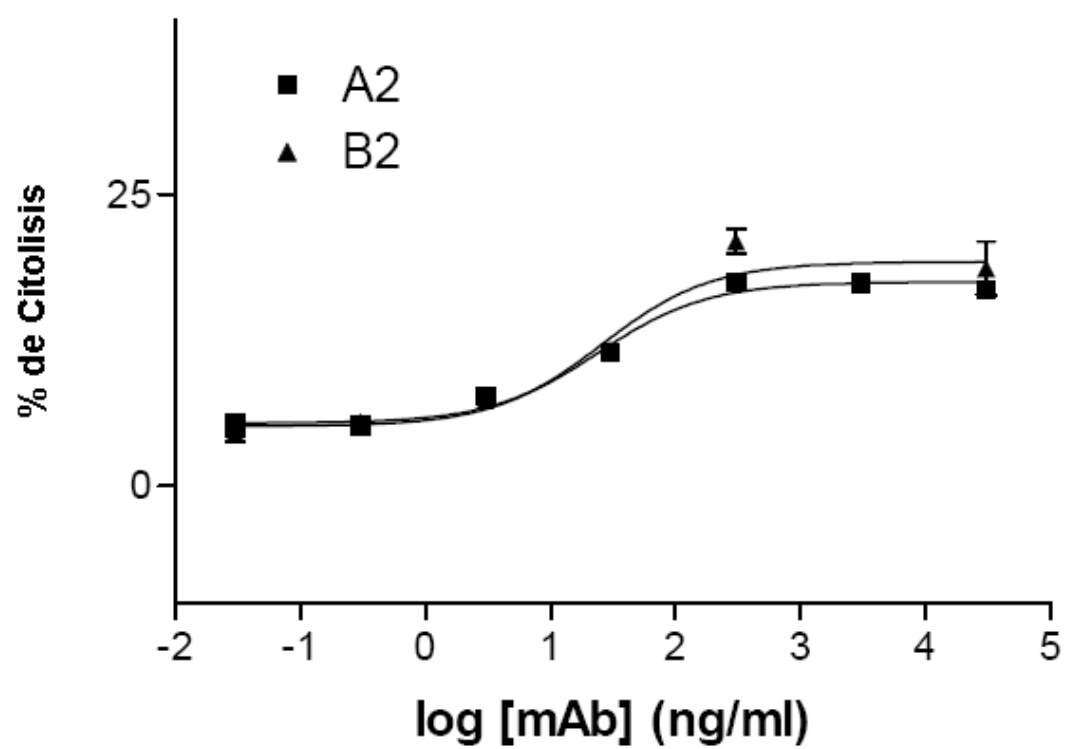


Fig. 17

