

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 240**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2005 E 11009020 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2441777**

54 Título: **Polipéptidos y anticuerpos obtenidos a partir de células de leucemia linfocítica crónica y usos de los mismos**

30 Prioridad:

20.07.2004 US 894672

23.11.2004 US 996316

30.06.2005 US 171567

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2016

73 Titular/es:

ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

352 Knotter Drive

Cheshire, CT 06410, US

72 Inventor/es:

BOWDISH, KATHERINE S.;

MCWHIRTER, JOHN;

KRETZ-ROMMEL, ANKE y

MARUYAMA, TOSHIAKI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 569 240 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

Polipéptidos y anticuerpos obtenidos a partir de células de leucemia linfocítica crónica y usos de los mismos

5 Campo técnico

Se divulgan tratamientos del cáncer que utilizan una terapia que proporciona una combinación de dos mecanismos. Más específicamente, esta divulgación se refiere al tratamiento del cáncer utilizando una terapia que: 1) interfiere con la interacción entre CD200 y su receptor para bloquear la supresión inmunitaria promoviendo de este modo la erradicación de las células cancerosas; y 2) destruir de forma directa las células cancerosas mediante a) citotoxicidad celular mediada por el complemento o dependiente de anticuerpos o b) mediante la dirección de células utilizando una molécula de fusión que incluye una porción de dirección hacia CD200.

15 Antecedentes

La leucemia linfocítica crónica (LLC) una enfermedad de los leucocitos y es la forma más común de leucemia en el hemisferio occidental. La LLC representa un grupo diverso de enfermedades que se relacionan con el crecimiento de linfocitos malignos que crecen de forma lenta pero tienen un periodo de vida extenso. La LLC se clasifica en diversas categorías que incluyen, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B) de los tipos clásico y mixto, leucemia prolinfocítica de linfocitos B y linfocitos T, leucemia de linfocitos pilosos, y leucemia linfocítica granular grande.

De todos los distintos tipos de LLC, la LLC-B representa aproximadamente el 30 por ciento de todas las leucemias. Aunque se produce de forma más frecuente en individuos de más de 50 años de edad, se ve cada vez más en personas más jóvenes. La LLC-B se caracteriza por la acumulación de linfocitos B que son morfológicamente normales pero biológicamente inmaduros, lo que conduce a una pérdida de función. La función normal de los linfocitos es combatir la infección. Sin embargo, en la LLC-B, los linfocitos se acumulan en la sangre y la médula ósea y provocan la hinchazón de los nódulos linfáticos. La producción de médula ósea normal y células sanguíneas normales se reduce y los pacientes con frecuencia experimentan anemia grave así como recuentos plaquetarios bajos. Esto puede plantear el riesgo de hemorragia con peligro para la vida y el desarrollo de infecciones serias debido al reducido número de leucocitos.

Para comprender adicionalmente las enfermedades tales como la leucemia, es importante tener líneas celulares adecuadas que puedan utilizarse como herramientas para la investigación de su etiología, patogenia y biología. Los ejemplos de líneas celulares B-linfoideas de ser humano malignas incluyen la leucemia linfoblástica aguda pre-B (Reh), el linfoma difuso de células grandes (WSU-DLCL2), y la macroglobulinemia de Waldenstrom (WSU-WM). Desafortunadamente, muchas de las líneas celulares existentes no representan a los tipos más clínicamente comunes de leucemia y linfoma.

El uso *in vitro* de la infección por el virus de Epstein Barr (VEB) ha dado lugar a algunas líneas celulares derivadas de LLC, en particular líneas celulares de la LLC-B, que son representativas de las células malignas. El fenotipo de estas líneas celulares es distinto del de los tumores *in vivo* y en lugar de tener las características de las líneas de LLC-B tienden a ser semejantes a las líneas celulares linfoblastoideas. Los intentos para immortalizar células de LLC-B con la ayuda de la infección por VEB han tenido poco éxito. Las razones para esto no son claras pero se sabe que no se debe a la carencia de la expresión del receptor, la unión o la captación del VEB. Wells *et al.* encontraron que las células LLC-B se detuvieron en la fase G1/S del ciclo celular y que la transformación asociada con el ADN del VEB no se expresó. Esto sugiere que la interacción del VEB con las células CLL-B es diferente de la de con los linfocitos B. Además las líneas celulares de LLC transformadas con VEB parecen diferenciarse, poseyendo una morfología más semejante a las líneas celulares linfoblastoides (LCL) immortalizadas mediante el VEB.

Se ha establecido de forma previa una línea celular de LLC negativa para VEB, WSU-CLL (Mohammad *et al.*, (1996) Leukemia 10(1):130-7). Sin embargo, no se conoce otras de tales líneas celulares.

Diversos mecanismos desempeñan una función en la respuesta corporal a una patología, incluyendo al cáncer y a la LLC. Por ejemplo, los linfocitos auxiliares T CD4⁺ desempeñan una función crucial en una respuesta inmunitaria eficaz contra diversos tumores malignos proporcionando factores estimulantes para las células efectuadas. Se cree que los linfocitos T citotóxicos son las células más eficaces para eliminar células cancerosas, y que los linfocitos T auxiliares estimulan a los linfocitos T citotóxicos mediante la secreción de citocinas Th1 tales como IL-2 e IFN-γ. En diversos tumores malignos, los linfocitos T auxiliares han mostrado tener un fenotipo modificado en comparación con las células encontradas en individuos sanos. Una de las características destacadas modificadas es la producción disminuida de las citocinas Th1 y un cambio a la producción de citocinas Th2. (Véase, por ejemplo, Kiani, *et al.*, Haematologica 88:754-761 (2003); Maggio, *et al.*, Ann Oncol 13 Suppl 1:52-56 (2002); Ito, *et al.*, Cancer 85:2359-2367 (1999); Podhorecka, *et al.*, Leuk Res 26:657-660 (2002); Tatsumi, *et al.*, J Exp Med 196:619-628 (2002); Agarwal, *et al.*, Immunol Invest 32:17-30 (2003); Smyth, *et al.*, Ann Surg Oncol 10:455-462 (2003); Contasta, *et al.*, Cancer Biother Radiopharm 18:549-557 (2003); Lauerova, *et al.*, Neoplasma 49:159-166(2002).) Volviendo a lo

anterior, el cambio de citocinas a un perfil Th1 ha mostrado que aumenta los efectos antitumorales de los linfocitos T. (Véase Winter, *et al.*, Immunology 108:409-419 (2003); Inagawa, *et al.*, Anticancer Res 18:3957-3964 (1998).

Los mecanismos que subyacen a la aptitud de las células tumorales para dirigir la expresión de citocinas de linfocitos T auxiliares desde Th1 a Th2, incluyen la secreción de citocinas tales como IL-10 o TGF- β así como la expresión de moléculas de superficie que interactúan con las células del sistema inmunitario. Se ha implicado en la supresión inmunitaria a OX-/CD200, una molécula que se expresa en la superficie de células dendríticas, que posee un alto grado de homología con las moléculas de la familia génica de las inmunoglobulinas (Gorczyński *et al.*, Transplantation 65:1106-1114 (1998)) y se ha proporcionado prueba de que células que expresan OX-2/CD200 pueden inhibir la estimulación de la producción de citocinas Th1. Gorczyński *et al.*, demostraron en un modelo de ratón que la infusión del Fc de OX-2/CD200 suprime el rechazo de células tumorales en un modelo animal que utiliza células tumorales leucémicas (Clin Exp Immunol 126:220-229 (2001)).

Los documentos WO02/11762 y WO99/24565 divulgan anticuerpos inhibidores de OX-2/CD200.

Son deseables métodos mejorados para tratar personas que padecen cáncer o LLC, especialmente hasta el punto que puedan potenciar la actividad de linfocitos T.

Sumario

Un aspecto se proporciona una línea celular de LLC de origen maligno que no está establecida mediante immortalización con VEB. La línea celular se obtuvo de células de LLC primarias y está depositada con el número de acceso PTA-3920. En un aspecto preferente, la línea celular es CLL-AAT. CLL-AAT es una línea celular de LLC-B obtenida de una célula primaria de LLC-B.

En un aspecto adicional, la línea celular CLL-AAT se utiliza para generar anticuerpos monoclonales útiles en el diagnóstico y/o tratamiento de la LLC. Los anticuerpos se pueden generar mediante el uso de células como inmunógenos, como se divulga en el presente documento, provocando en animales una respuesta inmunitaria, a partir de los que se pueden aislar anticuerpos monoclonales. Se puede determinar la secuencia de tales anticuerpos y producir variantes de los mismos mediante técnicas recombinantes. En este aspecto, las "variantes" incluyen anticuerpos quiméricos, injertados con CDR, humanizados y completamente humanos, basándose en la secuencia de los anticuerpos monoclonales.

Además, se pueden seleccionar anticuerpos obtenidos de bibliotecas recombinantes ("anticuerpos de fagos") utilizando las células descritas en el presente documento, o polipéptidos derivados de las mismas, como señuelo para aislar los anticuerpos basándose en la especificidad de diana.

En un aspecto adicional más, los anticuerpos se pueden generar mediante selección de bibliotecas de anticuerpos utilizando células de LLC primarias, o antígenos obtenidos de las mismas, y exploradas y/o caracterizadas adicionalmente utilizando una línea celular de LLC tal como, por ejemplo, la línea celular de LLC descrita en el presente documento. Por consiguiente, se proporciona un método para la caracterización de un anticuerpo específico para LLC, el cual incluye la evaluación de la unión del anticuerpo a una línea celular de LLC.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para la identificación de proteínas expresadas exclusivamente en células de LLC empleando la línea celular CLL-AAT, mediante métodos bien conocidos para los expertos en la materia, tal como inmunoprecipitación seguida de análisis de espectroscopia de masas. Tales proteínas se pueden expresar exclusivamente en la línea celular CLL-AAT, o en células primarias obtenidas de pacientes de LLC.

Para identificar agentes capaces de modular las características de crecimiento de las células se pueden explorar bibliotecas de moléculas pequeñas (muchas disponibles de forma comercial) utilizando la línea celular CLL-AAT en un ensayo basado en células. Por ejemplo, se pueden identificar agentes que modulen la apoptosis en la línea celular CLL-ATT o que inhiban el crecimiento y/o la proliferación de las mismas. Tales agentes son candidatos para el desarrollo de componentes terapéuticos.

Los ácidos nucleicos aislados a partir de líneas celulares CLL-AAT se pueden utilizar en experimentos de hibridación substractiva para identificar genes específicos de LLC, o en análisis de micromatrices (por ejemplo, experimentos en chips génicos). Se pueden identificar los genes cuya transcripción está modulada en células de LLC. El polipéptido o los productos génicos de ácidos nucleicos identificados de esta manera, son útiles ya que conducen al desarrollo de terapias de anticuerpo o de moléculas pequeñas para la LLC.

En un aspecto preferente, la línea celular CLL-AAT se puede utilizar para identificar anticuerpos internalizantes, los cuales se unen a componentes de la superficie celular que la célula internaliza. Tales anticuerpos son candidatos para el uso terapéutico. En particular, se pueden explorar de esta manera anticuerpos monocatenarios, los cuales permanecen estables en el citoplasma y conservan actividad de unión intracelular.

En otro aspecto más, se describe un tratamiento terapéutico en el cual se explora en un paciente la presencia de un polipéptido que está regulado de forma positiva mediante una célula cancerosa maligna, y se administra al paciente un anticuerpo que interfiere con la ruta metabólica del polipéptido regulado de forma positiva.

La presente divulgación adicionalmente se dirige a métodos en los que se hace una determinación en cuanto a si OX2/CD200 está regulada de forma positiva en un sujeto y, si es así, administrar al sujeto una terapia que potencia la respuesta inmunitaria. Se puede determinar la regulación positiva de OX2/CD200 mediante la medición de los niveles de OX2/CD200 de forma directa, o mediante el control del nivel de cualquier marcador que correlaciona con OX2/CD200. Las terapias inmunomoduladoras adecuadas incluyen la administración de agentes que bloquean la regulación negativa de los linfocitos T o de las células presentadoras de antígeno, la administración de agentes que potencian la coestimulación positiva de linfocitos T, vacunas para el cáncer, adyuvantes generales que estimulan el sistema inmunitario o el tratamiento con citocinas tales como IL-2, GM-CSF e IFN-gamma. En aspectos particularmente útiles la terapia que potencia la respuesta inmunitaria incluye la administración de un polipéptido que se une a OX2/CD200, de forma opcional en combinación con una o más de otras terapias inmunomoduladoras. En otro aspecto, el polipéptido se une a un receptor de OX2/CD200.

En otro aspecto, los métodos de acuerdo con esta divulgación se utilizan para tratar en un sujeto una patología en la cual OX2/CD200 está regulado de forma positiva, mediante la administración de un polipéptido que se une a OX2/CD200 o a un receptor de OX2/CD200 al sujeto aquejado de la patología. En una realización, la patología tratada mediante estos métodos incluye cáncer, específicamente, en otras realizaciones, LLC.

En un aspecto particularmente útil, de acuerdo con esta divulgación una terapia del cáncer incluye i) la administración de un anticuerpo que interfiere con la interacción entre CD200 y su receptor para bloquear la supresión inmunitaria, promoviendo de este modo la erradicación de las células cancerosas; y ii) la administración de una molécula de fusión que incluye una porción de dirección hacia CD200 para destruir de forma directa células cancerosas. Como alternativa, el anticuerpo destruye de forma directa las células cancerosas a través de citotoxicidad celular mediada por el complemento o dependiente de anticuerpos.

En otro aspecto de acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan métodos para controlar el progreso de un tratamiento terapéutico. El método implica la administración de una terapia inmunomoduladora y la determinación de los niveles de OX2/CD200 por lo menos dos veces al día para determinar la eficacia de la terapia.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para evaluar el efecto inmunomodulador de moléculas que expresan las células cancerosas. En estos métodos, se identifica una molécula que expresa o regula de forma positiva una célula cancerosa (por ejemplo, de forma experimental o a partir de una base de datos). Se administran a un sujeto las células cancerosas, los linfocitos y las moléculas que una célula cancerosa expresa o regula de forma positiva, y se controla la tasa de crecimiento de las células cancerosas. El número de linfocitos administrado se predetermina para ser a) suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas o b) insuficiente para desacelerar el crecimiento de células cancerosas. La molécula que una célula cancerosa expresa o regula de forma positiva se puede administrar como la molécula o la porción activa de la propia molécula, o mediante la administración de células que producen o expresan la molécula o porciones de la misma de forma natural, o mediante la administración de células que se han modificado por ingeniería genética para producir o expresar la molécula o porciones de la misma. Si se observa cualquier cambio en la tasa de crecimiento de las células cancerosas en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos, se considera que la molécula tiene un efecto inmunomodulador. Por ejemplo, si el número de linfocitos administrado es suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas y la tasa de crecimiento observada de las células tumorales es mayor en comparación con la tasa de crecimiento de cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos, la molécula que una célula cancerosa expresa o regula de forma positiva se considera inmunosupresora. Como otro ejemplo, si el número de linfocitos administrado es insuficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas y la tasa de crecimiento observada de las células tumorales está desacelerada en comparación con la tasa de crecimiento de cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos, el compuesto se considera potenciador inmunitario. Una vez que el efecto inmunomodulador de la molécula se establece, los compuestos que potencian o inhiben la actividad de la molécula se pueden identificar de acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento. El efecto potenciador o inhibidor puede ser el resultado de la interacción directa con la molécula que la célula cancerosa expresa o regula de forma positiva, o puede ser el resultado de una interacción con otras moléculas en la ruta metabólica del compuesto que la célula cancerosa expresa o regula de forma positiva.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para evaluar el efecto inmunomodulador de un compuesto. En estos métodos se administran a un sujeto las células cancerosas, los linfocitos y los compuestos a evaluar, y se controla la tasa de crecimiento de las células cancerosas. El número de linfocitos administrado se predetermina para ser a) suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas o b) insuficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas. El compuesto a evaluar se puede administrar como el propio compuesto, o mediante la administración de células que producen el compuesto de forma natural, o mediante la administración de células que se han modificado por ingeniería genética para producir el compuesto. Si se observa cualquier cambio en la tasa de crecimiento de las células cancerosas en comparación con la tasa de crecimiento de

cuando las células tumorales o linfocitos de donantes se administran solos, se considera que el compuesto tiene un efecto inmunomodulador. Por ejemplo, si el número de linfocitos suministrados es suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas y la tasa de crecimiento observada de las células tumorales es mayor en comparación con la tasa de crecimiento de cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos, el compuesto se considera inmunosupresor. Como otro ejemplo, si el número de linfocitos administrado es insuficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas y la tasa de crecimiento observada de las células tumorales se reduce en comparación con la tasa de crecimiento de cuando las células tumorales o los linfocitos de donantes se administran solos, el compuesto se considera potenciador inmunitario.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra de forma esquemática las etapas normales implicadas en la selección de superficie de células de bibliotecas de anticuerpos mediante separación de células activadas de forma magnética (MACS).

La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados del ELISA de célula completa que demuestra la unión de clones de scFv seleccionados a células LLC-B primarias en ausencia de unión a CMSP de ser humano normales. La designación 2°+3° en esta y otras figuras se refiere a los pocillos de control negativo teñidos con anticuerpos de ratón anti HA y anti ratón de detección, solos. La designación Biblioteca RSC-S en esta y otras figuras se refiere a anticuerpos solubles preparados a partir de la biblioteca no seleccionada de scFv de conejo original. La designación conjunto R3/RSC-S en esta y otras figuras, se refiere a anticuerpos solubles preparados a partir del conjunto entero de anticuerpos scFv a partir de la tercera ronda de exploración. Se utilizó el anticuerpo anti CD5 como un control positivo para verificar que se habían sembrado en placa números iguales de células LLC-B y CMSP en cada pocillo. Las Figuras 3a y 3b muestran los resultados del ELISA de célula completa que compara la unión de los anticuerpos scFv seleccionados a células LLC-B primarias y a linfocitos B primarios de ser humano normales. Se utilizó como un control positivo el anticuerpo anti CD19 para verificar que se había sembrado en placa igual número de células LLC-B y de linfocitos B normales en cada pocillo. Los otros controles fueron como se describe en la leyenda de la Figura 2.

Las Figuras 4a y 4b muestran los resultados del ELISA de célula completa utilizado para determinar si los clones de scFv se unen a antígenos específicos de paciente (es decir, idiotipo) o específicos de tipo sanguíneo (es decir HLA). Se analizó la unión de cada clon a CMSP aisladas de tres pacientes distintos de LLC-B. Los clones que se unieron a solo a la muestra de un paciente se consideraron que eran específicos de paciente o de tipo sanguíneo.

Las Figuras 5a y 5b muestran los resultados del ELISA de célula completa que compara la unión de los clones de scFv a células de LLC-B primarias y a tres líneas celulares leucémicas de ser humano. Ramos es una línea de linfocitos B maduros obtenida de un linfoma de Burkitt. RL es una línea linfocitos B obtenida de un linfoma no-Hodgkin. TF-1 es una línea celular eritroblastode obtenida de una eritroleucemia.

Las Figuras 6a, 6b y 6c muestran los resultados del ELISA de célula completa que comparan la unión de los clones de scFv a células de LLC-B primarias y a CLL-AAT, una línea celular obtenida de un paciente de LLC-B. Las células TF-1 se incluyeron como un control negativo.

La Figura 7 muestra la especificidad de unión de los anticuerpos scFv de acuerdo con esta divulgación según se analizó mediante citometría de flujo de 3-colores. En células mononucleares de sangre periférica normales, el antígeno reconocido mediante scFv-9 se expresó de forma moderada en linfocitos B y se expresó de forma débil en una subpoblación de linfocitos T. Se analizaron CMSP de un donante normal mediante citometría de flujo de 3 colores utilizando anti CD5-FITC, anti CD19-PerCP, y scFv-9/anti HA-biotina/estreptavidina-PE.

Las Figuras 8a, 8b y 8c muestran los niveles de expresión de los antígenos reconocidos mediante los anticuerpos scFv de acuerdo con esta divulgación. Los antígenos que reconocen scFv-3 y scFv-9 se sobreexpresaban en el tumor LLC primario a partir del cual la línea celular CLL-AAT se obtuvo. Las CMSP primarias del paciente de LLC utilizadas para establecer la línea celular CLL-AAT o las CMSP de un donante normal, se tiñeron con el anticuerpo scFv y se analizaron mediante citometría de flujo. ScFv-3 y scFv-9 tiñen las células de LLC de forma más brillante que las CMSP, normales según se mide mediante las intensidades de fluorescencia medias.

Las Figuras 9A - 9C proporcionan un sumario de las secuencias de CDR y las especificidades de unión de anticuerpos los scFv seleccionados.

La Figura 10 es la Tabla 2 que muestra un sumario de los resultados de citometría de flujo que compara los niveles de expresión de los antígenos de scFv en las células de LLC primarias contra las CMSP normales, como se describe en las Figuras 8a-8c.

La Figura 11 es una tabla que muestra un sumario de los resultados de citometría de flujo que compara los niveles de expresión del antígeno de scFv-9 con el porcentaje de células CD38⁺ en células mononucleares de sangre periférica aisladas de diez pacientes de LLC.

La Figura 12 muestra la identificación de antígenos de scFv mediante inmunoprecipitación y espectrometría de masas. Las células CLL-AAT se marcaron con una solución de sulfo-NHS-LC- biotina 0,5mg/ml (Pierce) en PBS, pH 8,0, durante 30 min. Después del lavado exhaustivo con PBS para eliminar la biotina que no reaccionó, las células se rompieron mediante cavitación por nitrógeno y mediante centrifugación diferencial se aisló la fracción microsomal. La fracción microsomal se resuspendió en tampón de lisis NP40 y se purificó de forma previa de forma exhaustiva con suero de conejo normal y proteína A Sefarosa. Los antígenos se inmunoprecipitaron con anticuerpos scFv etiquetados con HA acoplados a esferas de agarosa de anti HA de rata (Roche). Después de la inmunoprecipitación, los antígenos se separaron mediante SDS-PAGE y se detectaron mediante transferencia de Western utilizando estreptavidina-fosfatasa alcalina (FA) o mediante tinción con Coomassie G-250. Se utilizó como un control negativo ScFv-7, un anticuerpo que no se une a células CLL-AAT. Las bandas de antígeno se cortaron del gel teñido con

Coomassie y se identificaron mediante espectrometría de masas (EM). La MALDI-MS se realizó en el Proteomics Core Facility del The Scripps Research Institute (La Jolla, CA). La μ LC/MS/MS se realizó en el Harvard Microchemistry Facility (Cambridge, MA).

La Figura 13 muestra que tres anticuerpos scFv se unen de forma específica a células 293-EBNA transfectadas de forma transitoria con un clon de ADNc de OX-2/CD200 de ser humano. Mediante RT-PCR se clonó un ADNc de OX-2/CD200 a partir de células de LLC y se insertó en el vector de expresión de mamífero pCEP4 (Invitrogen). El plásmido PCEP4-CD200 o el correspondiente vector vacío pCEP4 se transfectaron en células 293-EBNA utilizando reactivo Polyfect (QUIGEN). Dos días después de la transfección, se analizó la unión de los anticuerpos scFv a las células mediante citometría de flujo.

La Figura 14 muestra que la presencia de las células transfectadas con OX-2/CD200 dio como resultado la regulación negativa de citocinas Th1 tales como IL-2 e IFN- γ . La adición del anticuerpo anti OX-2/CD200 30 μ g/ml restableció de forma completa la respuesta Th1.

La Figura 15 muestra que la presencia de las células de LLC en una reacción de linfocitos mixta dio como resultado la regulación negativa de la respuesta Th1 para IL-2.

La Figura 16 muestra que la presencia de células de LLC en una reacción de linfocitos mixta dio como resultado una regulación negativa de la respuesta Th1 para IFN- γ .

Las Figuras 17A y B muestran la media $\pm$ DE de volúmenes tumorales para todos los grupos de ratones NOD/SCID, que se inyectaron por vía subcutánea con 4×10^5 células RAJI en presencia o ausencia de células LSP de ser humano.

La Figura 18 muestra los resultados de los análisis estadísticos realizados utilizando 2 pruebas paramétricas (prueba t de Student y prueba de Welch) y una prueba no paramétrica (la prueba de Wilcoxon).

La Figura 19A muestra los resultados de los ELISA de clones de kappa de IgG1 después de 3 rondas de selección sobre CD200-Fc capturados en anticuerpo de cabra anti Fc de IgG de ratón.

La Figura 19B muestra los resultados de los ELISA de clones de kappa de IgG2a representativos después de 3 rondas de exploración sobre CD200-Fc capturado en anticuerpo de cabra anti Fc de IgG de ratón.

La Figura 19C muestra los resultados de los ELISA de clones de kappa de IgG1 representativos después de 3 rondas de selección sobre CD200-Fc recubierto de forma directa en pocillos de microtitulación.

La Figura 19D muestra los resultados de los ELISA de clones de kappa de IgG2a representativos después de 3 rondas de selección sobre CD200-Fc recubierto directamente sobre pocillos de microtitulación.

La Figura 20A muestra los resultados de citometría de flujo de clones IgG1 representativos seleccionados sobre CD200-Fc capturado en anti Fc de IgG de ratón de cabra.

La Figura 20B muestra los resultados de citometría de flujo de clones IgG2a representativos seleccionados sobre CD200-Fc capturado con anti Fc de IgG de ratón de cabra.

La Figura 20C muestra los resultados de citometría de flujo de clones de IgG1 representativos seleccionados sobre CD200-Fc recubierto de forma directa.

La Figura 20D muestra los resultados de citometría de flujo de clones de clones IgG2a representativos seleccionados sobre CD200-Fc recubierto de forma directa.

La Figura 21A muestra la secuencia de aminoácidos deducida de regiones de complementariedad de cadena pesada de clones específicos de CD200.

La Figura 21B muestra la secuencia de aminoácidos deducida de regiones de complementariedad de cadena pesada de clones específicos de CD200.

La Figura 22 muestra la capacidad de clones seleccionados para bloquear la interacción de CD200 con su receptor (CD200R) en un ensayo de esferas fluorescentes.

La Figura 23 muestra las secuencias de aminoácidos deducidas de Fabs de CD200 seleccionados para quimerización.

La Figura 24 muestra los resultados de los ELISA de IgG quimérica obtenida a partir de sobrenadante de cultivo de una transfección transitoria a pequeña escala.

La Figura 25 muestra los resultados del ensayo de inhibición de esferas sobre IgG purificada que muestran que todos los anticuerpos dirigidos contra CD200 bloquean muy bien la interacción receptor-ligando.

Las Figuras 26A y 26B muestran que la presencia de células de LLC anula de forma completa la producción de IFN- γ y la mayoría de la de IL-2 observadas en la reacción de linfocitos mixta pero que la presencia de cualquiera de los anticuerpos permite la producción de estas citocinas Th1.

La Figura 26C muestra que la producción de IL-10 se reguló de forma negativa en presencia de los anticuerpos.

La Figura 27 muestra la capacidad de destrucción de células tumorales que expresan CD200 en un ensayo de citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediado por células (ADCC). Todos los anticuerpos de CD200 quiméricos de ratón produjeron niveles similares de lisis cuando se cultivaron con células positivas para CD200.

La Figura 28 muestra un ejemplo representativo de 10 experimentos que utilizan distintos donantes de LSP en comparación con un grupo que solamente recibió células tumorales, analizado mediante una prueba t de Student independiente. Se observaron diferencias significativas en los grupos que recibieron 5 o 10 millones de LSP, pero no en el grupo que recibió 1 millón de LSP a partir del día 32.

La Figura 29 muestra un ejemplo representativo de 10 experimentos que utilizan distintos donantes de LSP en comparación con un grupo que recibió solamente células tumorales, analizado mediante prueba t de Student independiente de dos colas. Se observaron diferencias significativas en los grupos que recibieron 10 millones de LSP para los dos donantes, pero no en el grupo que recibió 2 millones de LSP a partir del día 8.

La Figura 30(a) muestra células RAJI infectadas con células tumorales que expresan CD200 transducidas a partir de un vector de lentivirus que parecían crecer de forma algo más lenta que sus células RAJI parentales. La diferencia de crecimiento entre las células transducidas y las parentales no alcanzaron la significación estadística.

La Figura 30(b) muestra la presencia de LSP redujo el crecimiento tumoral en las células RAJI transducidas con el CD200 invertido (CD200 no funcional) en hasta el 84 % cuando se inyectaron 5 o 10×10^6 LSP, indicando que este donante particular rechaza de forma muy fuerte las células tumorales RAJI

La Figura 30(c) muestra resultados que indican que la expresión de CD200 en células tumorales, en efecto, evita que el sistema inmunitario desacelere el crecimiento tumoral. Este estudio también demuestra la utilidad del modelo RAJI/LSP para evaluar compuestos o moléculas inmunosupresores.

Las Figuras 31(a)-(d) muestra si los efectos vistos en el modelo RAJI/MSP también se puede observar con otros modelos de células tumorales.

La Figura 31 (a) muestra que las células tumorales Namalwa producen un rápido crecimiento tumoral sin diferencia significativa entre células transducidas y parentales.

La Figura 31(b) muestra la presencia de LSP ralentiza el crecimiento tumoral en aproximadamente el 50 %. Los resultados de la prueba t de Student de 2 colas mostraron que las diferencias entre el grupo tratado con LSP contra los grupos que recibieron solamente células tumorales eran estadísticamente significativas.

Las Figuras 31(c) y (d) muestran el crecimiento tumoral en los grupos que recibieron células Namalwa que expresan CD200 y LSP fue similar al crecimiento tumoral en el grupo que recibió células Namalwa. Estos datos confirman que la expresión de CD200 en células tumorales evita la desaceleración del crecimiento tumoral mediante el sistema inmunitario del ser humano.

La Figura 32 muestra resultados que demuestran que el modelo RAJI LSP es un modo eficaz para evaluar la eficacia de componentes inmunopotenciadores.

La Figura 33 muestra que la expresión de CD200 en las células tumorales evita que las células inmunitarias reduzcan el crecimiento tumoral.

La Figura 34 muestra que la expresión de CD200 en las células tumorales evita que las células inmunitarias reduzcan el crecimiento tumoral.

Descripción detallada de realizaciones preferentes

De acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan métodos para determinar si OX-2/CD200 se regula de forma positiva en un sujeto y, si es así, administrar al sujeto una terapia que potencia la respuesta inmunitaria. Los ejemplos ilustrativos de terapias inmunomoduladoras adecuadas incluyen la administración de agentes que bloquean la regulación negativa de linfocitos T o de células presentadoras de antígeno (por ejemplo, anticuerpos anti CTLA4, anticuerpos anti PD-L1, anticuerpos anti PDL-2, anticuerpos anti PD-1 y similares) o la administración de agentes que potencian la coestimulación de linfocitos T (por ejemplo, anticuerpos anti CD40 o anticuerpos anti 4-1BB) o la administración de agentes que aumenten el número de linfocitos citolíticos naturales (células NK) o la actividad de linfocitos T (por ejemplo anticuerpos anti CD200 solos o en combinación con inhibidores tales como los IMiD, talidomida, o análogos de talidomida). Además, la terapia inmunomoduladora podrían ser vacunas para el cáncer tales como células dendríticas cargadas con células tumorales, ARN tumoral o ADN tumoral, proteínas tumorales o péptidos tumorales, proteínas de choque térmico (hsp) obtenidas de pacientes o adyuvantes generales que estimulan el sistema inmunitario a diversos niveles tales como CpG, Luivac, Biostim, Ribomynyl, Imudon, Bronchovaxom, o cualquier otro componente que active receptores del sistema inmunitario innato (por ejemplo, receptores similares a toll). También, la terapia inmunomoduladora podría incluir el tratamiento con citocinas tales como IL-2, GM-CSF e IFN-gamma.

En aspectos particularmente útiles la terapia que potencia la respuesta inmunitaria es la administración de un polipéptido que se une a OX-2/CD200, solo o en combinación con una de las anteriormente mencionadas terapias inmunomoduladoras. En general, los polipéptidos utilizados en la presente divulgación se pueden construir utilizando distintas técnicas que son conocidas para los expertos en la materia. En un aspecto, los polipéptidos se obtienen mediante síntesis química. En otros aspectos, los polipéptidos son anticuerpos o están contruidos a partir de un fragmento o de varios fragmentos de uno o más anticuerpos.

Preferentemente, los polipéptidos utilizados en los métodos de la presente divulgación se obtienen a partir de una línea celular de LLC. "LLC", como se usa en el presente documento, se refiere a leucemia linfocítica crónica que implica cualquier linfocito que incluye, pero sin limitación, diversas fases del desarrollo de linfocitos B y linfocitos T que incluyen, pero sin limitación, LLC de linfocitos B ("LLC-B"). LLC-B, como se usa en el presente documento, se refiere a la leucemia con un fenotipo de linfocito B maduro que es $CD5^+$, $CD23^+$, $CD20^{dim+}$, slg^{dim+} , y detenido en G0/G1 del ciclo celular. En un aspecto adicional, la línea celular de LLC se utiliza para generar polipéptidos, incluyendo anticuerpos, útiles en el diagnóstico y/o el tratamiento de una patología en la que OX-2/CD200 se regula de forma positiva, incluyendo cáncer y LLC.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" se refiere a anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a una diana seleccionada. Se incluyen anticuerpos Fab, Fv, scFv, Fab' y $F(ab')_2$, monoclonales y policlonales, anticuerpos modificados por ingeniería genética (incluyendo quiméricos, injertados con CDR y humanizados, anticuerpos completamente humanos, y anticuerpos seleccionados de forma artificial), y anticuerpos sintéticos o semisintéticos producidos utilizando presentación de fagos o técnicas alternativas. Los

fragmentos pequeños, tales como Fv y scFv, poseen propiedades ventajosas para aplicaciones en diagnóstico y terapéuticas, debido a su pequeño tamaño y consecuente distribución tisular superior.

Los anticuerpos se pueden generar utilizando las células como inmunógenos, como se describe en el presente documento, generando así una respuesta inmunitaria en animales a partir de los cuales se pueden aislar los anticuerpos monoclonales. Se puede determinar la secuencia de tales anticuerpos y producir variantes de los mismos mediante técnicas recombinantes. En este aspecto, "variantes" incluye anticuerpos quiméricos, injertados con CDR, humanizados y completamente humanos basándose en la secuencia de los anticuerpos monoclonales, así como polipéptidos capaces de unirse a OX-2/CD200.

Además, se pueden seleccionar los anticuerpos obtenidos a partir de bibliotecas recombinantes ("anticuerpos de fagos") utilizando las células descritas en el presente documento, o polipéptidos obtenidos de las mismas, como señuelo para aislar los anticuerpos o polipéptidos basándose en la especificidad de diana.

En un aspecto adicional más, los anticuerpos o polipéptidos se pueden generar mediante la selección de bibliotecas de anticuerpos utilizando células de LLC primarias, o antígenos obtenidos de las mismas, y se pueden explorar y/o caracterizar adicionalmente utilizando una línea celular de LLC, tal como, por ejemplo, la línea celular de LLC descrita en el presente documento. Por consiguiente, se divulga un método para la caracterización de un anticuerpo o polipéptido específico para LLC, el cual incluye la evaluación de la unión del anticuerpo o polipéptido a una línea celular de LLC.

Preparación de líneas celulares

Las líneas celulares se pueden producir de acuerdo con metodologías establecidas conocidas para los expertos en la materia. En general, las líneas celulares se producen mediante el cultivo de células primarias obtenidas de un paciente hasta que las células inmortalizadas se generan de forma espontánea en cultivo. Después se aíslan estas células y adicionalmente se cultivan para producir poblaciones celulares clonales o células que muestren resistencia a la apoptosis.

Por ejemplo, las células de LLC se pueden aislar a partir de sangre periférica extraída de un paciente que padece LLC. Las células se pueden lavar, y opcionalmente inmunotipificar para determinar el tipo o los tipos de las células presente(s). Posteriormente, las células se pueden cultivar en un medio, tal como un medio que contiene IL-4. De forma provechosa, se reemplaza todo o parte del medio una o más veces durante el proceso de cultivo. Las líneas celulares se pueden aislar de este modo, e identificarse mediante el crecimiento aumentado en cultivo.

En otro aspecto se proporciona una línea celular de LLC de origen maligno que no está establecida mediante inmortalización con VEB. "Origen maligno" se refiere a la obtención de la línea celular a partir de células de LLC primarias malignas, a diferencia de células no proliferativas que están transformadas, por ejemplo, con VEB. Las líneas celulares útiles de acuerdo con esta divulgación pueden ser ellas mismas o no de fenotipo maligno. Una línea de LLC que tiene un fenotipo "maligno" comprende crecimiento celular no unido al medio de sustrato que se caracteriza por ciclos repetidos de crecimiento celular y que muestra resistencia a la apoptosis. La línea celular, la cual se obtuvo de células de LLC primarias, está depositada con el número de acceso de la ATCC n.º PTA-3920. En un aspecto preferente la línea celular es CLL-AAT. CLL-AAT es una línea celular de LLC-B, obtenida de una célula primaria de LLC-B.

En un aspecto, las proteínas expresadas exclusivamente en células de LLC se identifican empleando la línea celular CLL-AAT mediante métodos bien conocidos para los expertos en la materia, tales como mediante inmunoprecipitación seguida de análisis de espectroscopia de masas. Tales proteínas pueden expresarse exclusivamente en la línea celular CLL-AAT, o en células primarias obtenidas de pacientes de LLC.

Las bibliotecas de moléculas pequeñas (muchas disponibles de forma comercial) se pueden explorar utilizando la línea celular CLL-AAT en un ensayo basado en células para identificar agentes capaces de modular las características de crecimiento de las células. Por ejemplo, se pueden identificar agentes que modulan la apoptosis en la línea celular CLL-AAT, o que inhiben el crecimiento y/o la proliferación de las mismas. Tales agentes son candidatos para el desarrollo de compuestos terapéuticos.

Se pueden utilizar ácidos nucleicos aislados a partir de líneas celulares CLL-AAT en experimentos de hibridación substractiva para identificar genes específicos de LLC o en análisis de micromatrices (por ejemplo, experimentos de chips génicos). Se pueden identificar los genes cuya transcripción se modula en células de LLC. Los polipéptidos o productos génicos de ácidos nucleicos identificados de esta manera son útiles ya que conducen al desarrollo de terapias de anticuerpos o de moléculas pequeñas para la LLC.

En un aspecto, se puede utilizar la línea celular CLL-AAT para identificar anticuerpos internalizantes, los cuales se unen a componentes en la superficie celular y que después la célula internaliza. Tales anticuerpos son candidatos para el uso terapéutico. En particular, se pueden explorar de esta manera anticuerpos monocatenarios, los cuales permanecen estables en el citoplasma y los cuales conservan actividad de unión intracelular.

Preparación de anticuerpos monoclonales

Se puede utilizar la tecnología del ADN recombinante para mejorar los anticuerpos producidos de acuerdo con esta divulgación. Por lo tanto, se pueden construir anticuerpos quiméricos para disminuir la inmunogenicidad de los mismos en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Además, la inmunogenicidad se puede minimizar mediante la humanización de los anticuerpos mediante el injerto de CDR y, de forma opcional, la modificación de la región marco conservada. Véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.225.539.

Los anticuerpos se pueden obtener a partir de suero animal, o, en el caso de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, producirse en cultivo celular. Se puede utilizar la tecnología del ADN recombinante para producir anticuerpos de acuerdo con el procedimiento establecido, en cultivos bacterianos o preferentemente de células de mamífero. Preferentemente, el sistema de cultivo celular seleccionado secreta el producto de anticuerpo.

En otro aspecto, un proceso para la producción de un anticuerpo divulgado en el presente documento incluye el cultivo de un hospedador, por ejemplo *E. coli*, o de una célula de mamífero, que se ha transformado con un vector híbrido. El vector incluye uno o más casetes de expresión que contiene un promotor unido operativamente a una primera secuencia de ADN que codifica un péptido señal unido en el marco de lectura adecuado a una segunda secuencia de ADN que codifica la proteína del anticuerpo. Después se recolecta y se aísla la proteína del anticuerpo. De forma opcional, el casete de expresión puede incluir un promotor unido operativamente a secuencias de ADN policistrónicas, por ejemplo bicistrónicas, que codifican proteínas de anticuerpo unidas operativamente cada una de forma individual a un péptido o señal en el marco de lectura adecuado.

La multiplicación *in vitro* de las células de hibridoma o de las células hospedadoras de mamífero se lleva a cabo en medio de cultivo adecuado, el cual incluye el medio de cultivo convencional habitual (tal como, por ejemplo Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) o medio RPMI 1640), reabastecidas de forma opcional con un suero de mamífero (por ejemplo suero fetal de ternera), u oligoelementos y complementos que sostienen el crecimiento (por ejemplo, células cebadoras tales como células de exudado peritoneal de ratón normales, células esplénicas, macrófagos de médula ósea, 2-aminoetanol, insulina, transferrina, lipoproteína de baja densidad, ácido oleico, o similares). Así mismo, la multiplicación de células hospedadoras que son células bacterianas o células de levaduras se lleva a cabo en medio de cultivo adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, para medio de cultivo adecuado de bacterias se incluye medio LE, NZCYM, NZYM, NZM, Caldo Terrific, SOB, SOC, 2 x YT, o Medio Mínimo M9. Para levaduras, los medios de cultivo adecuados incluyen medio YPD, YEPD, Medio Mínimo o Medio Dropout Mínimo Completo.

La producción *in vitro* proporciona preparaciones de anticuerpos relativamente puras y permite el cambio de escala para proporcionar grandes cantidades de los anticuerpos deseados. Se conocen en la técnica las técnicas para el cultivo de células bacterianas, de levaduras, vegetales o de mamíferos e incluyen el cultivo en suspensión homogéneo (por ejemplo, en un reactor de inyección de aire o en un reactor de agitación continuo), o el cultivo celular inmovilizado o atrapado (por ejemplo en fibra hueca, microcápsulas, en microesferas de agarosa o cartuchos de cerámica).

También se pueden obtener grandes cantidades de los anticuerpos deseados mediante la multiplicación *in vivo* de células de mamífero. Para este fin, las células de hibridoma que producen los anticuerpos deseados se inyectan en mamíferos histocompatibles para provocar el crecimiento de tumores que producen anticuerpo. De forma opcional, los animales se estimulan antes de la inyección con un hidrocarburo, en especial aceites minerales tales como pristano (tetrametil pentadecano). Después de una a tres semanas los anticuerpos se aíslan a partir de líquidos corporales de los mamíferos. Por ejemplo, las células de hibridoma obtenidas mediante fusión de células de mieloma adecuadas con células esplénicas de ratones Balb/c que producen anticuerpos, o células transfectadas obtenidas de la línea celular de hibridoma Sp2/0 que producen los anticuerpos deseados, se inyectan por vía intraperitoneal en ratones Balb/c pretratados de forma opcional con pristano. Después de una o dos semanas, se toma fluido ascítico de los animales.

Las técnicas anteriores y otras, se discuten en, por ejemplo, Kohler y Milstein, (1975) Nature 256:495-497; Patente de Estados Unidos n.º 4.376.110; Harlow y Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor. Las técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpo recombinantes se describen en las referencias anteriores y también en, por ejemplo, el documento WO97/08320; la Patente de Estados Unidos n.º 5.427.908; la Patente de Estados Unidos n.º 5.508.717; Smith, 1985, Science, Vol. 225, pág. 1315-1317; Parmley y Smith, 1988, Gene 73, pág. 305-318; De La Cruz *et al.*, 1988, Journal of Biological Chemistry, 263 pág. 4318-4322; la Patente de Estados Unidos n.º 5.403.484; la Patente de Estados Unidos n.º 5.223.409; el documento WO88/06630; el documento WO92/15679; la Patente de Estados Unidos n.º 5.780.279; la Patente de Estados Unidos n.º 5.571.698; la Patente de Estados Unidos n.º 6.040.136; Davis *et al.*, 1999, Cancer Metastasis Rev., 18(4):421-5; Taylor, *et al.*, Nucleic Acids Research 20 (1992): 6287-6295; Tomizuka *et al.*, Proc. Natl. Academy of Sciences USA 97(2) (2000): 722-727.

Se analizan los anticuerpos deseados en los sobrenadantes del cultivo celular, preferentemente mediante tinción inmunofluorescente de células de LLC, mediante inmunotransferencia, mediante un inmunoensayo de enzima, por ejemplo un ensayo tipo sandwich o un ensayo "dot", o un radioinmunoensayo.

Para el aislamiento de los anticuerpos, se pueden concentrar las inmunoglobulinas en los sobrenadantes del cultivo o en el fluido ascítico, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato de amonio, diálisis contra material higroscópico tal como polietilenglicol, filtración a través de membranas selectivas, o similares. Si es necesario y/o se desea, los anticuerpos se purifican mediante métodos de cromatografía habituales, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía a través de DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno) afinidad, por ejemplo, cromatografía de afinidad con uno o más polipéptidos de superficie obtenidos de una línea celular de LLC de acuerdo con esta divulgación, o con Proteína A o G.

Otro aspecto proporciona un proceso para la preparación de una línea celular bacteriana que secreta anticuerpos dirigidos contra la línea celular caracterizado porque en que un mamífero adecuado, por ejemplo un conejo, se inmuniza con muestras de pacientes de LLC agrupadas. Se construye una librería de presentación de fagos producida a partir del conejo inmunizado y se seleccionan los anticuerpos deseados de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (tales como, por ejemplo, los métodos divulgados en las diversas referencias incorporadas en el presente documento por referencia).

También se contemplan células de hibridoma que secretan los anticuerpos monoclonales. Las células de hibridoma preferentes son genéticamente estables, secretan anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento con la especificidad deseada y pueden activarse a partir de cultivos ultracongelados mediante descongelación y reclonación.

En otro aspecto se proporciona un proceso que se describe en el presente documento para la preparación de una línea celular de hibridoma que secreta anticuerpos monoclonales dirigidos contra la línea celular de LLC. En ese proceso, un mamífero adecuado, por ejemplo un ratón Balb/c, se inmuniza con uno o más polipéptidos o fragmentos antigénicos de los mismos obtenidos de una célula descrita en esta divulgación, la propia línea celular, o un transportador antigénico que contiene un polipéptido purificado según se describe. Se crecen brevemente en cultivo las células que producen anticuerpo del mamífero inmunizado o fusionadas con células de una línea celular de mieloma adecuada. Las células híbridas obtenidas en la fusión se clonan, y se seleccionan los clones celulares que secretan los anticuerpos deseados. Por ejemplo, células esplénicas de ratones Balb/c inmunizados con la presente línea celular se fusionan con células de la línea celular de mieloma PAI o la línea celular de mieloma Sp2/0-Ag 14, la secreción de los anticuerpos deseados se exploran las células híbridas obtenidas, y las células de hibridoma positivas se clonan.

Es preferente un proceso para la preparación de una línea celular de hibridoma, caracterizado por que se inmunizan ratones Balb/c mediante inyección por vía subcutánea y/o intraperitoneal de entre 10^6 y 10^7 células de una línea celular de acuerdo con esta divulgación, varias veces, por ejemplo cuatro a seis veces, a lo largo de varios meses, por ejemplo entre dos y cuatro meses. Dos a cuatro días después de la última inyección se toman células esplénicas de los ratones inmunizados y se fusionan con células de la línea celular de mieloma PAI en presencia de un promotor de la fusión, preferentemente polietilenglicol. Preferentemente, las células de mieloma se fusionan con un exceso de, de tres a veinte veces de células esplénicas de los ratones inmunizados en una solución que contiene aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 50 % de polietilenglicol de un peso molecular de alrededor de 4.000. Después de la fusión, las células se expanden en medio de cultivo adecuado como se describe anteriormente en el presente documento, complementado con un medio de selección, por ejemplo medio HAT, a intervalos regulares para evitar el sobrecrecimiento de las células de mieloma normales sobre las células de hibridoma deseadas.

En un aspecto adicional, se produce el ADN recombinante que comprende un inserto que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos dirigidos contra la línea celular descrita anteriormente en el presente documento. El término ADN incluye ADN monocatenarios codificantes, ADN bicatenarios que consisten en dichos ADN codificantes y en ADN complementarios de ellos, o estos propios ADN complementarios (monocatenarios).

Además, el ADN que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos dirigidos contra la línea celular divulgada en el presente documento, se puede sintetizar de forma enzimática o química teniendo la secuencia codificante de ADN auténtica que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o el dominio variable de cadena ligera, o un mutante de los mismos. Un mutante del ADN auténtico es un ADN que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos mencionados anteriormente en los cuales uno o más aminoácidos se eliminan o intercambian con uno o más de otros aminoácidos. Preferentemente, dicha modificación o modificaciones son por fuera de las CDR del dominio variable de cadena pesada y/o del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo en las aplicaciones de humanización y de optimización de la expresión. La expresión ADN mutante también abarca mutaciones silenciosas en las que uno o más nucleótidos se sustituyen por otros nucleótidos con los nuevos codones codifican para el mismo o los mismos aminoácidos. La expresión secuencia mutante también incluye una secuencia degenerada. Las secuencias degeneradas son degeneradas en el sentido del código genético en que un número ilimitado de nucleótidos se reemplaza por otros nucleótidos sin que dé como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada de forma original. Tales secuencias degeneradas pueden ser útiles debido a sus distintos sitios de restricción y/o frecuencia de codones particulares, los cuales son preferentes para el hospedador específico,

particularmente *E. coli*, para obtener una expresión óptima del dominio variable de cadena pesada murino y/o un dominio variable de cadena ligera murino.

El término mutante pretende incluir un ADN mutante obtenido mediante mutagénesis *in vitro* del ADN auténtico de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

Para el ensamblaje de moléculas de inmunoglobulina tetraméricas completas y la expresión de anticuerpos quiméricos, los insertos de ADN recombinante que codifican los dominios variables de cadena pesada y ligera se fusionan con los correspondientes ADN que codifican los dominios constantes de cadena pesada y ligera, después se transfieren en células hospedadoras apropiadas, por ejemplo después de la incorporación en vectores híbridos.

También se proporcionan los ADN recombinantes que incluyen un inserto que codifica un dominio variable de cadena pesada murino de un anticuerpo dirigido contra la línea celular divulgada en el presente documento fusionado con un dominio constante de ser humano γ , por ejemplo $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ o $\gamma 4$, preferentemente $\gamma 1$ o $\gamma 4$. También se proporcionan ADN recombinantes que incluyen un inserto que codifica un dominio variable de cadena ligera murino de un anticuerpo dirigido contra la línea celular divulgada en el presente documento fusionado a un dominio constante de ser humano κ o λ , preferentemente κ .

Otro aspecto incumbe a ADN recombinantes que codifican un polipéptido recombinante en el que el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera están unidos por medio de un grupo espaciador, comprendiendo de forma opcional una secuencia señal que facilita el procesamiento del anticuerpo en las células hospedadoras y/o un ADN que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo y/o un sitio de escisión y/o un espaciador peptídico y/o una molécula efectora.

El ADN que codifica una molécula efectora se pretende que sea un ADN que codifica las moléculas efectoras útiles en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Por lo tanto, son particularmente indicadas moléculas efectoras que sean toxinas o enzimas, especialmente enzimas capaces de catalizar la activación de profármacos. El ADN que codifica tal molécula efectora tiene la secuencia de un ADN que codifica la enzima o toxina de origen natural, o un mutante de la misma, y se puede preparar mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Usos de los presente anticuerpos/polipéptidos

Los polipéptidos y/o anticuerpos utilizados en el presente documento son especialmente indicados para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

Los presentes anticuerpos se pueden administrar como un producto terapéutico a pacientes de cáncer, especialmente, pero sin limitación, pacientes de LLC. En algunas realizaciones, los anticuerpos son capaces de interferir con la interacción de CD200 y sus receptores. Esta interferencia puede bloquear el efecto supresor inmunitario de CD200. Tales anticuerpos pueden promover la erradicación de las células cancerosas mediante la mejora de la respuesta inmunitaria.

También se puede administrar el anticuerpo anti CD200 en combinación con otros compuestos, vacunas o quimioterapias inmunomoduladoras. Por ejemplo, la eliminación de linfocitos T reguladores existentes con reactivos tales como anti CD25 o ciclofosfamida, se consigue en una realización particularmente útil antes del comienzo del tratamiento anti CD200. Mediante terapia anti CD200 se también se potencia la eficacia terapéutica de las terapias mieloablativas seguidas de trasplante de médula ósea o la transferencia adoptiva de linfocitos T reactivos con células de LLC. Además, el tratamiento anti CD200 puede potenciar esencialmente la eficacia de vacunas contra el cáncer tales como células dendríticas cargadas con células de LLC o proteínas, péptidos o ARN obtenidos de tales células, proteínas de choque térmico (hsp) obtenidas de pacientes, péptidos o proteínas tumorales. En otro aspecto, se utiliza un anticuerpo anti CD200 en combinación con un compuesto inmunoestimulante, tal como CpG, agonistas del receptor similar a toll o cualquier otro adyuvante, anticuerpos anti CTLA-4, y similares. En otras realizaciones más, la eficacia del tratamiento anti CD200 se mejora mediante el bloqueo de mecanismos inmunosupresores tales como anticuerpos anti PDL1 y/o 2, anticuerpos anti IL-10, anticuerpos anti IL-6, y similares. En otras realizaciones más, la eficacia del tratamiento anti CD200 se mejora mediante la administración de agentes que aumentan el número de células NK o de linfocitos T tales como el inhibidor de moléculas pequeñas IMiD, la talidomida, o los análogos de la talidomida.

También se pueden utilizar como una herramienta de diagnóstico los anticuerpos anti CD200 de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, se puede evaluar la expresión de anti CD200 en células cancerosas utilizando sangre obtenida de pacientes con cánceres hematopoyéticos, mediante análisis FACS utilizando anticuerpos anti CD200 en combinación con los marcadores de células cancerosas apropiados tales como, por ejemplo, CD38 y CD19 en células LLC. Se pueden seleccionar para el tratamiento con anticuerpos anti CD200 los pacientes con niveles de CD200 de por lo menos 1,4 veces por encima de los niveles encontrados en linfocitos B normales.

En otro ejemplo de utilización de los presentes anticuerpos anti CD200 como una herramienta de diagnóstico, se obtienen biopsias de pacientes con tumores malignos y se determina la expresión de CD200 mediante análisis

FACS utilizando anticuerpos anti CD200. Si las células tumorales expresan CD200 a niveles que son por lo menos 1,4 veces mayores en comparación con el tejido normal correspondiente, los pacientes de cáncer se seleccionan para la terapia inmunomoduladora. La terapia inmunomoduladora puede ser terapia anti CD200, pero también puede ser cualquier otra terapia que afecte el sistema inmunitario del paciente. Los ejemplos de terapias inmunomoduladoras adecuadas incluyen la administración de agentes que bloquean la regulación negativa de linfocitos T o de células presentadoras de antígeno (por ejemplo, anti CTLA4, anti PD-L1, anti PDL-2, anti PD-1) o la administración de agentes que potencian la coestimulación positiva de linfocitos T (por ejemplo, anti CD40 o anti 4-1BB). Además, la terapia inmunomoduladora puede ser la administración de agentes que aumenten el número de células NK o la actividad de linfocitos T (por ejemplo, anticuerpos anti CD200 solos o en combinación con inhibidores tales como IMiD, talidomida, o análogos de la talidomida) o la administración de agentes que agotan linfocitos T reguladores (por ejemplo, anticuerpos anti CD200 solos o en combinación con ONTAK). Además, la terapia inmunomoduladora podrían ser vacunas contra el cáncer tales como células dendríticas cargadas con células tumorales, ARN tumoral o ADN tumoral, proteína tumoral o péptidos tumorales, proteínas de choque térmico (hsp) obtenidas del paciente o adyuvantes generales que estimulan el sistema inmunitario a diversos niveles, tales como as CpG, Luivac, Biostim, Ribomynyl, Imudon, Bronchovaxom o cualquier otro compuesto que activa los receptores del sistema inmunitario innato (por ejemplo, receptores similar a toll). También, la terapia podría incluir el tratamiento con citocinas tales como IL-2, GM-CSF e IFN-gamma.

En otro aspecto de acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan métodos para el control del progreso y/o la eficacia de un tratamiento terapéutico. El método implica la administración de una terapia inmunomoduladora y la determinación de los niveles de OX-2/CD200 en un sujeto por lo menos dos veces para determinar la eficacia de la terapia. Por ejemplo, se pueden averiguar los niveles de OX-2/CD200 anteriores al tratamiento y, después de por lo menos una administración de la terapia, se pueden determinar otra vez los niveles de OX-2/CD200. Una disminución de los niveles de OX-2/CD200 es indicativa de un tratamiento eficaz. El médico puede utilizar la medición de los niveles de OX-2/CD200 como una guía para aumentar la cantidad o frecuencia de la dosificación de la terapia. Por supuesto debería entenderse que los niveles de OX-2/CD200 se pueden controlar de forma directa o, de forma alternativa, se puede controlar cualquier marcador que correlacione con OX-2/CD200.

También se pueden utilizar los presentes anticuerpos para detectar células cancerosas *in vivo*. Esto se consigue mediante el marcaje del anticuerpo, la administración del anticuerpo marcado o sujeto, y después la formación de imágenes del sujeto. Los ejemplos de marcadores útiles para el diagnóstico por imágenes de acuerdo con la presente divulgación, son radiomarcadores tales como ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{25}I , ^3H , ^{14}C , y ^{188}Rh , marcadores fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, marcadores activos de resonancia magnética nuclear, isótopos que emiten positrones detectables mediante un escáner de tomografía de emisión de positrones ("PET"), quimioluminizadores tales como luciferina, y marcadores enzimáticos tales como peroxidasa o fosfatasa. También se pueden emplear emisores de radiación de corto alcance, tales como isótopos detectables mediante sondas detectoras de corto alcance, tales como sondas transrectales. El anticuerpo se puede marcar con tales reactivos utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, véase Wensel y Meares, Radioimmunoimaging y Radioimmunotherapy, Elsevier, N.Y. (1983), para las técnicas que se refieren al radiomarcaje de anticuerpos. Véase también, D. Colcher *et al.*, "Use of Monoclonal Antibodies as Radiopharmaceuticals for the Localization of Human Carcinoma Xenografts in Athymic Mice", Meth. Enzymol. 121: 802-816 (1986).

De acuerdo con esta divulgación se puede utilizar un anticuerpo radiomarcado para pruebas de diagnóstico *in vitro*. La actividad específica de un anticuerpo, la porción de unión del mismo, la sonda o el ligando, depende de la semivida, la pureza isotópica de la marca radiactiva, y como la marca se incorpora en el agente biológico. En las pruebas de inmunoensayo, cuanto mayor es la actividad específica, mejor es en general la sensibilidad. Los procedimientos para el marcaje de anticuerpos con isótopos radioactivos se conocen en general en la técnica.

El anticuerpo radio marcado se puede administrar a un paciente en el cual se localiza en células cancerosas que portan el antígeno con el cual reacciona el anticuerpo, y se detecta o "producen imágenes" *in vivo* utilizando técnicas conocidas tales como exploración radionuclear utilizando, por ejemplo, una cámara gamma o tomografía de emisión. Véase por ejemplo, A. R. Bradwell *et al.*, "Developments in Antibody Imaging", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin *et al.*, (eds.), pág. 65-85 (Academic Press 1985). De modo alternativo, se puede utilizar un escáner de tomografía transaxial de emisión de positrones, tal como el designado Pet VI, localizado en Brookhaven National Laboratory, en el cual el radiomarcador emite positrones (por ejemplo, ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , y ^{13}N).

Se pueden preparar agentes biológicos marcados con fluoróforo y cromóforo a partir de residuos convencionales conocidos en la técnica. Debido a que los anticuerpos y otras proteínas absorben luz que tienen longitudes de onda de hasta aproximadamente 310 nm, se deberían seleccionar residuos fluorescentes que tengan considerable absorción a longitudes de onda por encima de 310 nm y preferentemente por encima de 400 nm. Stryer, Science, 162:526 (1968) y Brand, L. *et al.*, Annual Review of Biochemistry, 41:843-868 (1972), describen una diversidad de fluoróforos y cromóforos adecuados, que están incorporados por referencia por el presente documento. Los anticuerpos se pueden marcar con grupos cromóforos fluorescentes mediante procedimientos convencionales tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 3.940.475, 4.289.747, y 4.376.110.

En otros aspectos se contemplan anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente de ser humano o humanizados, que tienen especificidades de unión por, por lo menos dos antígenos distintos. En el presente caso, una de las especificidades de uniones es por el antígeno CD200 de una célula cancerosa, la otra es por cualquier otro antígeno, y preferentemente por una proteína de superficie celular o un receptor o una unidad de receptor.

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos están dentro del alcance de los expertos en la materia. De manera tradicional, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los cuales las dos cadenas pesadas tienen distintas especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Se pueden fusionar dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye por lo menos parte de la bisagra, las regiones CH2, y CH3. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de inspección separados, y se contranfectan en un organismo hospedador adecuado. Para detalles adicionales de los métodos ilustrativos actualmente conocidos para generar anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986), el documento WO 96/27011; Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985); Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992); Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993); y Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994); y Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

También se pueden utilizar los presentes anticuerpos para destruir de forma directa o eliminar células cancerosas *in vivo*. Esto implica la administración de anticuerpos (los cuales están fusionados de forma opcional a un fármaco citotóxico) a un sujeto que necesite tal tratamiento. Debido a que los anticuerpos reconocen CD200 en las células cancerosas, se destruyen cualquiera de tales células a las cuales se unen los anticuerpos.

En los casos en que los anticuerpos se utilizan solos para destruir o eliminar células cancerosas, tal destrucción o eliminación se puede efectuar iniciando las funciones inmunitarias endógenas del hospedador, tales como citotoxicidad celular mediada por el complemento o dependiente de anticuerpos. Los ensayos para determinar si un anticuerpo destruye células de esta manera están dentro del alcance de los expertos en la materia.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden utilizar para suministrar una diversidad de compuestos citotóxicos. Se puede fusionar cualquier compuesto citotóxico a los presentes anticuerpos. La fusión se puede conseguir de forma química o genética (por ejemplo, a través de la expresión como una única molécula fusionada). El compuesto citotóxico puede ser uno biológico, tal como un polipéptido, o una molécula pequeña. Como apreciarán los expertos en la materia, para moléculas pequeñas se utiliza la fusión química, mientras que para compuestos biológicos, se puede emplear fusión química o genética.

Los ejemplos no limitantes de compuestos citotóxicos incluyen fármacos terapéuticos, un compuesto que emite radiación, moléculas de origen vegetal, fúngico o bacteriano, proteínas biológicas, y mezclas de los mismos. Los fármacos citotóxicos pueden ser fármacos citotóxicos que actúan de forma intracelular, tales como emisores de radiación de corto alcance, que incluyen, por ejemplo, emisores α de corto alcance, de alta energía. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas se ejemplifican mediante, por ejemplo, el fragmento A de la toxina diftérica, los fragmentos activos de no unión de la toxina diftérica, la exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, sacrina alfa, ciertas proteínas de *Aleurites fodii*, ciertas proteínas de *Dianthina*, proteínas de *Phytolacca americana* (PAP, PAPII y PAP-S), El inhibidor de *Morodica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogillina, restrictocina, fenomicina, y enomicina. Los procedimientos para preparar polipéptidos de la inmunotoxina enzimáticamente activos se describen en los documentos WO84/03508 y WO85/03508.

Ciertos residuos citotóxicos se obtienen, por ejemplo, de adriamicina, clorambucilo, daunomicina, metotrexato, neocarcinostatina, y platino.

Los procedimientos para conjugar los anticuerpos con los agentes citotóxicos se han descrito de forma previa y están dentro del ámbito de un experto en la materia.

De modo alternativo, el anticuerpo se puede acoplar a emisores de radiación de alta energía, por ejemplo, un radioisótopo, tal como ^{131}I , un emisor γ , el cual, cuando se localiza en el sitio del tumor, da como resultado una destrucción de varios diámetros celulares. Véase, por ejemplo, S. E. Order, "Analysis, Results, y Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection y Therapy*, R. W. Baldwin *et al.* (eds.), pág. 303-316 (Academic Press 1985), el cual se incorpora por referencia por el presente documento. Otros radioisótopos adecuados incluyen emisores α , tales como ^{212}Bi , ^{213}Bi , y ^{211}At , y emisores β , tales como ^{186}Re e ^{90}Y .

La vía de administración de anticuerpos de los presentes anticuerpos (ya sea el anticuerpo puro, un anticuerpo marcado, un anticuerpo fusionado una toxina, etc.), está de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión mediante las vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, subcutánea, intraocular,

intraarterial, intratecal, inhalación o intralesional, o mediante sistemas de liberación sostenida. El anticuerpo se administra preferentemente de forma continua mediante infusión o mediante inyección de bolo. Se pueden administrar los anticuerpos de una manera local o sistémica.

Los presentes anticuerpos se pueden preparar en una mezcla con un transportador farmacéuticamente aceptable. Las técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición. Esta composición terapéutica se puede administrar por vía intravenosa o a través de la nariz o el pulmón, preferentemente como un líquido o un aerosol en polvo (liofilizado). También se puede administrar la composición por vía parenteral o subcutánea según se desee. Cuando se administra por vía sistémica, la composición farmacéutica debería estar estéril, sin pirógenos y en una solución parenteralmente aceptable teniendo en cuenta el pH, la isotonicidad, y la estabilidad. Estas condiciones son conocidas para los expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso incluyen composiciones en las que uno o más de los presentes anticuerpos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir sus propósitos pretendidos. De forma más específica, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de anticuerpo eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, en especial a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento. Las dosificaciones terapéuticamente eficaces se pueden determinar mediante el uso de métodos *in vitro* e *in vivo*.

En algunas realizaciones, los presentes anticuerpos que se unen a CD200 proporcionan el beneficio de bloquear la supresión inmunitaria en la LLC mediante la dirección hacia las células leucémicas directamente a través de CD200. De forma específica, la estimulación del sistema inmunitario puede permitir la erradicación de células de LLC del bazo y los nódulos linfáticos. Los solicitantes desconocen que se haya conseguido alguna erradicación exitosa de células de LLC de estos microentornos, con agentes que tengan como diana simplemente linfocitos B (tal como alemtuzumab). Por el contrario, linfocitos T reactivos para LLC pueden tener mejor acceso a estos órganos que los anticuerpos. En otras realizaciones, la destrucción directa de células se consigue mediante el etiquetado de células de LLC con anticuerpos anti CD200.

En aspectos particularmente útiles, la combinación de la destrucción directa de células y la conducción de la respuesta inmunitaria hacia un perfil Th1, proporciona una estrategia particularmente poderosa para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, se proporciona en un aspecto un tratamiento del cáncer en el que se administra a un paciente de cáncer un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, el cual se une a CD200 y a) bloquea la interacción entre CD200 y su receptor y b) destruye de forma directa las células cancerosas que expresan CD200. El mecanismo mediante el cual las células cancerosas se destruyen puede incluir, pero sin limitación, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); fusión con una toxina, fusión con un radiomarcador; fusión con un agente biológico implicado en destrucción celular; tal como granzima B o perforina; fusión con un virus citotóxico; fusión con una citocina tal como TNF- α o IFN- α . En un aspecto alternativo, un tratamiento del cáncer implica la administración de un anticuerpo que a) bloquea la interacción entre CD200 y su receptor y b) potencia la actividad de linfocitos T citotóxicos o de células NK contra el tumor. Tal potenciación de la actividad de las células T citotóxica o de las células NK puede, por ejemplo, combinarse mediante la fusión del anticuerpo con citocinas tales como, por ejemplo, IL-2, IL-12, IL-18, IL-13, e IL-5. Además, tal potenciación se puede conseguir mediante la administración de un anticuerpo anti CD200 en combinación con inhibidores tales como IMiD, talidomida, o los análogos de talidomida.

En otro aspecto más, el tratamiento del cáncer implica la administración de un anticuerpo que a) bloquea la interacción entre CD200 y su receptor y b) atrae a los linfocitos T a las células tumorales. La atracción de linfocitos T se puede conseguir mediante la función del Ac con quimiocinas tales como MIG, IP-10, I-TAC, CCL21, CCL5 o LIGHT. La acción combinada del bloqueo de la supresión inmunitaria y la destrucción de forma directa a través de la dirección del anticuerpo hacia las células tumorales es una estrategia exclusiva que proporciona eficacia aumentada.

Aunque la divulgación anterior se ha dirigido a los anticuerpos, en algunos aspectos se pueden utilizar polipéptidos obtenidos de tales anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación.

Usos de la línea celular de LLC

Hay muchas ventajas para el desarrollo de una línea celular de LLC, dado que proporciona una herramienta importante para el desarrollo del diagnóstico y los tratamientos para LLC, cáncer, u otras patologías que se caracterizan por niveles regulados de forma positiva de OX-2/CD200, por ejemplo, melanoma.

Una línea celular de acuerdo con esta divulgación se puede utilizar para estudios *in vitro* de la etiología, patogenia y biología de la LLC y de otras patologías caracterizadas por niveles regulados de forma positiva de OX-2/CD200. Esto ayuda a la identificación de agentes adecuados que son útiles en la terapia de estas enfermedades.

También se puede utilizar la línea celular para producir polipéptidos y/o anticuerpos monoclonales para el diagnóstico *in vitro* e *in vivo* de LLC, cáncer, y otras patologías caracterizadas por niveles regulados de forma positiva de OX-2/CD200 (por ejemplo, melanoma), como que se refiere anteriormente y para la exploración y/o caracterización de anticuerpos que se producen mediante otros métodos, tales como mediante la selección de bibliotecas de anticuerpos con células primarias y/o antígenos obtenidos de pacientes de LLC.

La línea celular se puede utilizar como tal, o se pueden obtener antígenos a partir de ella. De forma provechosa, tales antígenos son antígenos de superficie celular específicos para LLC. Se pueden aislar de forma directa a partir de líneas celulares de acuerdo con esta divulgación. Como alternativa, una biblioteca de expresión de ADNc preparada a partir de una línea celular descrita en el presente documento, se puede utilizar para expresar antígenos específicos de LLC, útiles para la selección y caracterización de anticuerpos anti LLC y para la identificación de antígenos específicos de LLC nuevos.

Se ha propuesto en la técnica el tratamiento de la LLC utilizando la terapia de anticuerpos monoclonales. De forma reciente, Hainsworth (Oncologist 5 (5) (2000) 376-384) ha descrito las terapias actuales obtenidas de anticuerpos monoclonales. La leucemia linfocítica en particular se considera como un buen candidato para esta estrategia terapéutica, debido a la presencia de múltiples antígenos específicos de linfocito en los tumores de linfocitos.

Se han utilizados exitosamente las terapias de anticuerpos existentes (tal como Rituximab®, dirigido contra el antígeno de CD20, el cual se expresa en la superficie de los linfocitos B) contra ciertas enfermedades linfocíticas. Sin embargo, en la LLC se expresa una menor densidad de antígenos CD20 en la superficie de los linfocitos B (Almasri *et al.*, Am. J. Hematol., 40 (4) (1992) 259-263).

La línea celular de LLC descrita en el presente documento permite así el desarrollo de anticuerpos anti LLC y polipéptidos nuevos que tienen especificidad por uno o más determinantes antigénicos de la presente línea celular de LLC, y su uso en la terapia y el diagnóstico de la LLC, el cáncer y otras patologías caracterizadas por niveles regulados de forma positiva de OX-2/CD200.

El anticuerpo o polipéptido se puede unir a un receptor con el cual normalmente interactúa OX-2/CD200, evitando o inhibiendo de este modo que OX-2/CD200 se una al receptor. En otra alternativa más, el anticuerpo se puede unir a un antígeno que modula la expresión de OX-2/CD200, evitando o inhibiendo de este modo la expresión normal o aumentada de OX-2/CD200. Debido a que la presencia de OX-2/CD200 se ha asociado con la respuesta inmunitaria reducida, sería deseable interferir con la ruta metabólica de OX-2/CD200 de tal modo que el sistema inmunitario del paciente pueda defender de forma más efectiva contra la patología, tal como el cáncer o la LLC.

En un aspecto particularmente útil, el polipéptido se une a OX-2/CD200. En una realización, el polipéptido puede ser un anticuerpo que se une a OX-2/CD200 y evita o inhibe que OX-2/CD200 interactúe con otras moléculas o receptores. Dado que las células de LLC y otras células que sobreexpresan OX-2/CD200 disminuyen en gran modo la producción de citocinas Th1, la administración del anticuerpo OX-2/CD200 o un polipéptido que se une a OX-2/CD200 a un sujeto que tiene niveles regulados de forma positiva de OX-2/CD200, restituye el nivel de citoquinas Th1. Por lo tanto, estos polipéptidos y/o anticuerpos pueden ser agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de la LLC y de otros cánceres o enfermedades que sobreexpresan OX-2/CD200.

Por lo tanto, en otro aspecto el método de la presente divulgación incluye las etapas de exploración de la presencia de OX-2/CD200 en un sujeto y la administración de un polipéptido que se une a OX-2/CD200. Por supuesto debería entenderse que la presencia de OX-2/CD200 se puede controlar de forma directa o, de forma alternativa, se puede detectar cualquier marcador que correlacione con OX-2/CD200. En un aspecto particularmente útil se explora la sobreexpresión de OX-2/CD200 en un paciente de LLC y se administra al paciente un anticuerpo que se une a OX-2/CD200. Uno de tales anticuerpos es el anticuerpo anti CD200 disponible de forma comercial de Serotec Inc. (3200 Atlantic Ave, Suite 105, Raleigh, NC 27604). Como se describe en detalle a continuación, otro de tales anticuerpos es scFv-9 (véase la Fig. 9B), el cual se une a OX-2/CD200.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para evaluar el efecto inmunomodulador de moléculas que expresan células cancerosas. En estos métodos primero se identifica una molécula que una célula cancerosa expresa o regula de forma positiva. La molécula se puede identificar a partir de una base de datos o de forma experimental. Las bases de datos que identifican moléculas que expresan o regulan de forma positiva las células cancerosas son conocidas e incluyen, por ejemplo, el proyecto de micromatrices de cáncer NC160 (<http://genome-www.stanford.edu/nci60/>) (Ross *et al.*, Nature Genetics 24: 227-34, 2000), la clasificación de Carcinomas (<http://www.gnf.org/cancer/epican/>) (Andrew I. Su *et al.*, "Molecular Classification of Human Carcinomas by Use of Gene Expression Signatures." Cancer Research 61:7388-7393, 2001), y el proyecto de caracterización molecular de Linfoma/Leucemia (<http://llmpp.nih.gov/lymphoma/>) (Alizadeh *et al.*, Nature 403: 503-11, 2000).

Los métodos experimentales útiles para la identificación de moléculas que las células cancerosas expresan o regulan de forma positiva también son conocidos e incluyen, por ejemplo, experimentos de micromatrices, PCR cuantitativa, FACS y análisis de Northern.

Se administran a un sujeto células cancerosas, linfocitos y la molécula identificada de forma previa que expresa una célula cancerosa, y se controla la tasa de crecimiento de las células cancerosas. En los presentes métodos se puede emplear cualquier tipo de células cancerosas. En algunos aspectos las células cancerosas expresan un componente inmunosupresor. En aspectos particularmente útiles las células cancerosas expresan o incluso sobreexpresan CD200. Las células cancerosas adecuadas incluyen, pero sin limitación, líneas celulares de linfoma tales como las líneas celulares RAJI o Namalwa. La cantidad de células cancerosas administrada puede variar desde aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 20×10^6 .

En el presente proceso se puede emplear cualquier tipo de linfocito. Los linfocitos adecuados incluyen, por ejemplo, LSP, linfocitos T, linfocitos T citotóxicos, células dendríticas o células NK. En realizaciones particularmente útiles, los linfocitos son linfocitos de ser humano, específicamente LSP de ser humano. El número de linfocitos que se administra se predetermina para ser a) suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas o b) insuficientes para desacelerar el crecimiento de células cancerosas. La cantidad de linfocitos administrados puede ser mayor que o igual al número de células cancerosas administradas, cuando se pretende que el número de linfocitos administrado sea suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas. En realizaciones, la cantidad de linfocitos administrados puede ser desde aproximadamente 5×10^6 a aproximadamente 10×10^6 , cuando se pretende que el número de linfocitos administrado sea suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas. La cantidad de linfocitos administrados puede ser menor que el número de células cancerosas administradas cuando se pretende que el número de linfocitos administrado sea insuficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas. En realizaciones, la cantidad de linfocitos administrados puede variar desde aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 4×10^6 , cuando se pretende que el número de linfocitos administrado sea insuficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas. Las cantidades anteriores son ilustrativas y se pueden determinar de forma experimental y utilizar en los presentes métodos otras cantidades adecuadas.

La molécula que una célula cancerosa expresa o regula de forma positiva se puede administrar como propia la molécula o la porción activa de la misma (aislada o generada de forma recombinante), o mediante la administración de células que producen la molécula de forma natural, o mediante la administración de células que se hayan modificado por ingeniería genética para producir la molécula o porciones de la misma. Los métodos para modificar por ingeniería genética células para expresar una molécula deseada son conocidos para los expertos en la materia. La cantidad de molécula administrada puede ser cualquier cantidad por encima de la cantidad encontrada en un individuo sano. Por ejemplo, la cantidad de la molécula administrada puede estar desde aproximadamente 1,4 veces por encima de lo que se encuentra en el mismo tipo de célula en un individuo sano, a aproximadamente 10.000 veces por encima de lo que se encuentra en el mismo tipo de célula en un individuo sano. Se debería entender que la molécula que se evalúa puede o no saberse que tiene algún grado de actividad inmunomoduladora. Por lo tanto, se pueden utilizar los presentes métodos para confirmar el efecto inmunomodulador de una molécula así como para determinar tal actividad desde el principio.

Se puede elegir cualquier animal pequeño como el sujeto al cual se administra las células cancerosas, linfocitos y la molécula. De forma provechosa, el sujeto puede estar inmunocomprometido. Los animales pequeños adecuados incluyen, por ejemplo, ratones inmunodeficientes, ratas irradiadas, cobayas irradiadas y similares.

La tasa de crecimiento de las células cancerosas se puede controlar utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, se puede controlar el crecimiento tumoral mediante la medición del largo y el ancho con un calibrador. Se puede calcular el volumen del tumor, por ejemplo, basándose en la multiplicación de la longitud del tumor por el ancho del tumor, y después multiplicando por un medio del ancho del tumor. La tasa de crecimiento de las células cancerosas se puede medir de forma periódica, tal como, por ejemplo, tres veces por semana. La tasa de crecimiento de las células cancerosas cuando se han administrado las células cancerosas y los linfocitos solos, se puede determinar mediante la administración de células cancerosas y linfocitos solos a un sujeto de control y medir de forma periódica el tamaño del tumor. Como alternativa, se pueden administrar de forma inicial las células cancerosas y linfocitos solos, y una vez que se establece una tasa de crecimiento basal, la molécula que expresa o regula de forma positiva una célula cancerosa se puede administrar posteriormente a un sujeto, y se puede medir la tasa de crecimiento de las células cancerosas después de la segunda administración. Como alternativa, con modelos sistémicos la tasa de crecimiento de las células cancerosas se puede controlar utilizando FACS, supervivencia u otras técnicas convencionales.

Si se observa cualquier cambio en la tasa de crecimiento de las células cancerosas en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos, se considera que la molécula tiene un efecto inmunomodulador. Si el número de linfocitos es suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas y la tasa de crecimiento de las células tumorales observada es mayor en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos, la molécula que una célula cancerosa expresa o regula de forma positiva se considera inmunosupresora. Si el número de linfocitos administrado es insuficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas y la tasa de crecimiento de las células tumorales observada está disminuida en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos, la molécula se considera potenciador inmunitario. Normalmente, para que el efecto inmunosupresor o potenciador inmunitario sea significativamente estadístico, la tasa de crecimiento de las células cancerosas observada puede ser de aproximadamente del 20 % a

aproximadamente el 1.000 % mayor que la tasa de crecimiento cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos.

Una vez que se establece el efecto inmunomodulador de la molécula, los compuestos que potencian o inhiben la actividad de la molécula se pueden identificar de acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento. El compuesto que potencia o inhibe la actividad de la molécula que de forma previa se halló que tiene efecto inmunomodulador, puede ser cualquier compuesto que modifique la interacción proteína/proteína que proporcione el efecto inmunomodulador. El efecto potenciador o inhibidor puede ser resultado de la interacción directa con el compuesto que la célula cancerosa expresa o regula de forma positiva o puede ser resultado de una interacción con otros compuestos en la ruta metabólica del compuesto que la célula cancerosa expresa o regula de forma positiva.

Por ejemplo, se pueden identificar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos funcionales que interactúan con la molécula que se ha hallado de forma previa que tiene un efecto inmunomodulador, el receptor con el cual la molécula interactúa, o alguna otra molécula en la ruta metabólica de la molécula responsable del efecto inmunomodulador. Las técnicas para preparar anticuerpos (incluyendo bibliotecas de anticuerpos) y de exploración de un efecto inhibidor o potenciador en ellos, serán obvias para los expertos en la materia. Como otro ejemplo, se puede explorar un efecto inhibidor o potenciador de moléculas pequeñas. Las técnicas para explorar un efecto inhibidor o potenciador en bibliotecas de moléculas pequeñas serán obvias para los expertos en la materia.

En otro aspecto, la presente divulgación contempla métodos para evaluar el efecto inmunomodulador de un compuesto. Es muy estimulante demostrar las propiedades inmunomoduladoras de compuestos o moléculas que actúan sobre el sistema inmunitario del ser humano en modelos de animales pequeños. Con frecuencia, los compuestos no actúan sobre el sistema inmunitario de animales pequeños, lo que requiere la reconstitución del sistema inmunitario del ser humano en ratones. La reconstitución se puede llevar a cabo mediante el injerto de diversos órganos inmunitarios fetales en ratones o mediante la inyección de linfocitos de ser humano, pero ninguno de los modelos descritos hasta la fecha ha demostrado ser útil para demostrar las propiedades inmunomoduladoras de compuestos o moléculas. Se cree que el sistema inmunitario desempeña una función importante en la erradicación de células cancerosas. Las células cancerosas han encontrado maneras de evadir el sistema inmunitario mediante la regulación positiva de receptores inmunosupresores.

Los presentes métodos para evaluar el efecto inmunomodulador de un compuesto se llevan a cabo mediante un modelo que mimetiza el injerto contra el efecto de leucemia observado en pacientes con leucemia que se infunden con linfocitos de donantes (por ejemplo, LSP), lo que da como resultado una remisión en hasta el 80 % de los pacientes. El método implica la administración de células cancerosas, linfocitos y los compuestos a evaluar a un sujeto, y se controla la tasa de crecimiento de las células cancerosas.

En los presentes métodos se puede emplear cualquier tipo de células cancerosas. En algunas realizaciones, las células cancerosas expresan un compuesto inmunosupresor. En realizaciones particularmente útiles, las células cancerosas expresan o incluso sobreexpresan CD200. Las células cancerosas adecuadas incluyen, pero sin limitación, líneas celulares de linfoma tales como las líneas celulares RAJI o Namalwa. La cantidad de células cancerosas administrada puede variar desde aproximadamente 2×10^6 a aproximadamente 20×10^6 .

En el presente proceso se puede emplear cualquier tipo de linfocito. Los linfocitos adecuados incluyen, por ejemplo, LSP, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos T citotóxicos, células NK. En realizaciones particularmente útiles, los linfocitos son linfocitos de ser humano, especialmente LSP de ser humano. El número de linfocitos que se administra se predetermina para ser a) suficientes para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas o b) insuficientes para desacelerar el crecimiento de células cancerosas. La cantidad de linfocitos administrados puede ser mayor que o igual al número de células cancerosas administradas cuando el número de linfocitos administrado se pretende que sea suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas. En realizaciones, la cantidad de linfocitos administrados puede ser desde aproximadamente 5×10^6 a aproximadamente 10×10^6 cuando el número de linfocitos administrado se pretende que sea suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas. La cantidad de linfocitos aproximados puede ser menor que el número de células cancerosas suministradas cuando el número de linfocitos administrado se pretende que sea insuficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas. En realizaciones, la cantidad de linfocitos administrados puede variar desde aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 4×10^6 cuando el número de linfocitos administrado se pretende que sea insuficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas. Las anteriores cantidades son ilustrativas y se pueden determinar otras cantidades adecuadas de forma experimental, y utilizar en los presentes métodos.

El compuesto que se valora puede ser cualquier compuesto cuyo efecto inmunomodulador se pretende determinar. Los ejemplos ilustrativos de compuestos incluyen los anticuerpos y péptidos descritos anteriormente en el presente documento. La cantidad administrada del compuesto que se evalúa puede variar desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg. El compuesto a evaluar puede administrarse como el propio compuesto, o mediante la administración de células que producen el compuesto de forma natural, o mediante la administración de células que se han modificado por ingeniería genética para producir el compuesto. Debería entenderse que puede saberse o no que el compuesto que se evalúa tiene algún grado de actividad inmunomoduladora. Por lo tanto, los presentes

métodos se pueden utilizar para confirmar el efecto inmunomodulador de un compuesto así como para determinar tal actividad desde el principio.

Se puede elegir cualquier animal pequeño como el sujeto al cual las células cancerosas, los linfocitos y el compuesto se administran. De forma provechosa, el sujeto puede estar inmunocomprometido. Los animales pequeños adecuados incluyen, por ejemplo, ratas inmunodeficientes, ratas irradiadas, cobayas irradiadas y similares.

La tasa de crecimiento de las células cancerosas se puede controlar utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, el crecimiento tumoral se puede controlar mediante la medición del largo y el ancho con un calibrador. El volumen tumoral se puede calcular, por ejemplo, basándose en la multiplicación de la longitud del tumor por el ancho del tumor y después multiplicando por un medio el ancho del tumor. La tasa de crecimiento de las células cancerosas se puede medir de forma periódica, tal como, por ejemplo, tres veces a la semana. La tasa de crecimiento de las células cancerosas cuando se han administrado las células cancerosas y los linfocitos solos se puede determinar mediante la administración de células cancerosas y linfocitos solos a un sujeto de control y la medición de forma periódica del tamaño tumoral. Como alternativa, de forma inicial se pueden administrar las células cancerosas y los linfocitos solos, y una vez que una tasa de crecimiento basal se establece, el compuesto a evaluar se puede administrar posteriormente al sujeto y después de la segunda administración se puede medir la tasa de crecimiento de las células cancerosas.

Cuando se inyectan en ratones inmunodeficientes células cancerosas tales como las líneas celulares de linfoma RAJI o Namalwa, la administración de cinco a 10 millones de LSP da como resultado un crecimiento tumoral significativamente más desacelerado. Por el contrario, bajos números de LSP (1-2 millones dependiendo del donante) no desacelera el crecimiento tumoral.

Si se observa cualquier cambio en la tasa de crecimiento de las células cancerosas en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos, la molécula se considera que tiene un efecto inmunomodulador. Si el número de linfocitos administrado es suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas y la tasa de crecimiento de las células tumorales observada es mayor en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos, el compuesto se considera inmunosupresor. Si el número de linfocitos administrado es insuficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas y la tasa de crecimiento de las células tumorales observada se desacelera, en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células tumorales y los linfocitos de donantes se administran solos, el compuesto se considera potenciador inmunitario.

Para que los expertos en la materia puedan ser más capaces de practicar las composiciones y métodos descritos en el presente documento, se proporcionan los siguientes ejemplos para fines de ilustración.

EJEMPLO 1

Aislamiento de la línea celular CLL-AAT

Establecimiento de la línea celular

Se obtuvo sangre periférica de un paciente diagnosticado con LLC. El recuento de leucocitos fue de $1,6 \times 10^8$ /ml. Las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). Las células se lavaron dos veces con Medio Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM) complementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor al 10 %, y se resuspendieron en 5 ml de IMDM/SFB al 10 % enfriado en hielo. Las células viables se recontaron mediante tinción con azul de tripán. Las células se mezclaron con un volumen equivalente de SFB al 85 % /DMSO al 15 % y se congelaron en alícuotas de 1 ml para el almacenamiento en nitrógeno líquido.

El inmunofenotipado mostró que >90 % de la población de linfocitos CD45⁺ expresó IgD, la cadena ligera kappa, CD5, CD19, y CD23. Esta población también expresó niveles bajos de IgM y CD20. Aproximadamente el 50% de las células expresó niveles altos de CD38. Las células fueron negativas para cadena ligera lambda, CD10 y CD138.

Se descongeló un alícuota de las células, se lavaron, y se resuspendieron a una densidad de 10^7 /ml en IMDM complementado con SFB inactivado por calor al 20 %, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina 100 µg/ml, 2-mercaptoetanol 50 µM, e IL-4 de ser humano recombinante 5 ng/ml (R & D Systems, Minneapolis, MN). Las células se cultivaron 37 °C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. El medio se reemplazó de forma parcial cada 4 días hasta que se observó el crecimiento continuo. Después de 5 semanas, el número de células en el cultivo comenzó a duplicarse aproximadamente cada 4 días. Esta línea celular se designó como CLL-AAT.

Caracterización de la línea celular

El inmunofenotipado de la línea celular mediante citometría de flujo mostró alta expresión de IgM, cadena ligera kappa, CD23, CD38, y CD138, moderada expresión CD19 y CD20, y expresión débil de IgD y CD5. La línea celular fue negativa para la cadena ligera lambda, CD4, CD8, y CD10.

El inmunofenotipado de la línea celular también se hizo con ELISA de célula completa, utilizando un panel de anticuerpos scFv de conejo que se habían seleccionado por la unión específica a células de LLC-B primarias. Todos estos anticuerpos scFv específicos de LLC también reconocieron la línea celular CLL-AAT. Por el contrario, la mayoría de los scFv no se unieron a las dos líneas celulares obtenidas de linfomas de linfocitos B: Ramos, una línea celular de linfoma de Burkitt, y RL, una línea celular de linfoma no Hodgkin.

EJEMPLO 2

Selección de anticuerpos scFv para antígenos de superficie celular específicos de LLC-B utilizando presentación de fagos de anticuerpos y selección de la superficie celular

Inmunizaciones y construcción de la biblioteca de anticuerpos scFv

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de sangre extraída de pacientes de LLC en la Scripps Clinic (La Jolla, CA). Se inmunizaron dos ratones con 2×10^7 CMSP agrupadas de 10 donantes con LLC distintos. Se hicieron tres inmunizaciones, dos inyecciones subcutáneas seguidas de una inyección intravenosa, a intervalos de tres semanas. Utilizando citometría de flujo se comprobaron los títulos de los sueros mediante la medición de la unión de la IgG del suero a células de LLC primarias. Cinco días después de la inmunización final, se recolectaron de los animales bazo, médula ósea y CMSP. Se aisló el ARN a partir de estos tejidos utilizando Tri-Reagent (Molecular Research Center, Inc). Se construyeron bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos monocatenarios Fv (scFv), como se describe anteriormente (Barbas *et al.*, (2001) Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Para la selección de superficie celular, se precipitaron con polietilenglicol (PEG) partículas de fagémido a partir de la biblioteca reamplificada, se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía seroalbúmina bovina (BSA) al 1 %, y se dializaron durante una noche contra PBS.

Selección de anticuerpos mediante selección de superficie celular

Las bibliotecas se enriquecieron en anticuerpos específicos de superficie de células de LLC mediante selección positiva-negativa con un clasificador de células activado de forma magnética (MACS) según describe Siegel *et al.* (1997, J. Immunol. Methods 206:73-85). Brevemente, las partículas de fagémido de la biblioteca de anticuerpos scFv se preincubaron en MPBS (leche desnatada al 2 %, azida sódica al 0,02 % en PBS, pH 7,4) durante una hora a 25 °C, para bloquear los sitios de unión no específicos. Se marcaron aproximadamente 10^7 células de LLC primarias con IgG de ratón anti CD5 e IgG de ratón Anti CD19 conjugadas a microesferas paramagnéticas (Milenyi Biotec, Sunnyvale, CA). Se retiraron las microesferas no unidas mediante lavado. Se mezclaron las células de LLC marcadas ("células diana") con un exceso de "células absorbentes negativas de antígeno", se sedimentaron, y se resuspendieron en 50 μ l (10^{10} - 10^{11} ufc) de partículas de fago. Las células absorbentes sirven para absorber el fago que se pega de forma no específica a las superficies celulares, así como el fago específico para antígenos "comunes" presentes en las células diana y las absorbentes. Las células absorbentes utilizadas fueron células TF-1 (una línea celular de eritroleucemia de ser humano) o linfocitos B de ser humano normales aislados de sangre periférica mediante selección negativa inmunomagnética (StemSep system, StemCell Technologies, Vancouver, Canada). La relación de células absorbentes respecto a las células diana fue de aproximadamente 10 veces por volumen. Después de una incubación de 30 minutos a 25 °C, la mezcla célula/fago se transfirió a una columna de separación MiniMACS MS+. La columna se lavó dos veces con 0,5 ml of MPBS, y una vez con 0,5 ml of PBS para eliminar el fago y las células absorbentes no unidos. Las células diana se eluyeron de la columna en 1 ml de PBS y se sedimentaron en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 15 segundos. Las partículas de fago capturadas se eluyeron mediante la resuspensión de las células diana en 200 μ l de tampón de elución ácido (HCl 0,1 N, pH ajustado a 2,2 con glicina, más BSA 1 mg/ml). Después de una incubación de 10 minutos a 25 °C, el tampón se neutralizó con 12 μ l de Tris base 2M, pH 10,5, y el fago eluido se amplificó en *E. coli* para la próxima ronda de selección. Para cada ronda de selección, se determinaron los títulos de fago de entrada y de salida. El título de entrada es el número de partículas de fago reamplificadas añadidas a la mezcla celular célula diana/célula absorbente, y el título de salida es el número de fago capturado eluido de las células diana. Se calcula un factor de enriquecimiento (E) utilizando la formula $E = (R_n \text{ salida} / R_n \text{ entrada}) / (R_1 \text{ salida} / R_1 \text{ entrada})$, donde R_1 = ronda 1 y R_n = ronda 2, 3, o 4. En la mayoría de los casos, hacia la tercera o cuarta ronda debería lograrse un factor de enriquecimiento de 10^2 - 10^3 veces.

Análisis de los conjuntos de anticuerpos enriquecidos después de la selección

Después de 3-5 rondas de exploración, mediante citometría de flujo y/o ELISA de célula completa se ensayó la unión de los conjuntos de fagos capturados a células de LLC:

1. Para producir un conjunto entero en la forma de anticuerpos solubles etiquetados con HA, se infectaron 2 ml de una cepa no supresora de *E. coli* (por ejemplo TOP10F') con 1 µl (10^9 - 10^{10} ufc) de partículas de fagémido. Se utilizó la librería no seleccionada original como un control negativo. Se añadió carbenicilina a una concentración final de 10 µM y el cultivo se incubó a 37 °C con agitación a 250 rpm durante 1 hora. Se añadieron 8 ml de medio SB que contenía carbenicilina 50 µg/ml y el cultivo se creció hasta una DO 600 de ~0,8. Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de scFv a partir del promotor Lac, y la agitación a 37 °C se continuó durante 4 horas. El cultivo se centrifugó a 3000xg durante 15'. El sobrenadante que contenía los anticuerpos solubles se filtró y se reservó en alícuotas de 1 ml a -20 °C.

2. Se determinó mediante citometría de flujo la unión de los conjuntos de anticuerpos scFv a las células diana contra las células absorbentes, utilizando como anticuerpo secundario anti HA de rata de alta afinidad (clon 3F10, Roche Molecular Biochemicals) y como anticuerpo terciario anti rata de burro conjugado con PE.

3. También se determinó la unión de los conjuntos de anticuerpos a las células diana contra las células absorbentes mediante ELISA de célula completa, según se describe a continuación.

Exploración individual de clones de scFv después de la selección

Para explorar clones de scFv individuales después de la selección, se infectaron células TOP10F' con conjuntos de fagos como se describe anteriormente, se extendieron en placas de LB que contenían carbenicilina y tetraciclina, y se incubaron durante una noche a 37 °C. Las colonias individuales se inocularon en placas de 96 pocillos profundas que contenían 0,6-1,0 ml de medio SB-carbenicilina por pocillo. Los cultivos se crecieron durante 6-8 horas en una incubadora con agitación HiGro (GeneMachines, San Carlos, CA) a 520 rpm a 37 °C. En este punto, se transfirió una alícuota de 90 µl desde cada pocillo a una placa de 96 pocillos profundos que contenían 10 µl de DMSO. Esta réplica en placa se almacenó a -80 °C. Se añadió IPTG a la placa original hasta una concentración final de 1 mM y se continuó la agitación durante 3 horas. Las placas se centrifugaron a 3000xg durante 15 minutos. Se transfirieron los sobrenadantes que contenían los anticuerpos scFv solubles a otra placa de 96 pocillos profundos y se almacenaron a -20 °C.

Para la exploración de anticuerpos scFv etiquetados con HA se desarrolló un método de ELISA de célula completa sensible:

1. Una placa de ELISA se recubre con concanavalina A (10 mg/ml en NaHCO_3 , 0,1 M, pH 8,6, CaCl_2 0,1 mM).
2. Después de lavar la placa con PBS, se añaden a cada pocillo $0,5 \times 10^5$ células diana o células absorbentes en 50 µl de PBS, y la placa se centrifuga a 250xg durante 10 minutos.
3. Se añaden 50 µl de glutaraldehído al 0,02 % en PBS y las células se fijan durante una noche a 4 °C.
4. Después del lavado con PBS, los sitios de unión no específicos se bloquean con PBS que contiene leche en polvo desnatada al 4 % durante 3 horas a temperatura ambiente.
5. Las células se incuban con 50 µl de anticuerpo scFv o Fab soluble etiquetado con HA (sobrenadante de TOP10F') durante 2 horas a temperatura ambiente, después se lava seis veces con PBS.
6. Los anticuerpos unidos se detectan utilizando un anticuerpo secundario anti HA de ratón (clon 12CA5) y un anticuerpo terciario anti IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (FA). Se obtiene una amplificación de la señal de aproximadamente 10 veces utilizando como anticuerpo terciario anti IgG ratón en oveja conjugado a AMDEX FA (Amersham Pharmacia Biotech). El anticuerpo AMDEX está conjugado a múltiples moléculas de FA a través de un esqueleto de dextrano. El color se desarrolla con el sustrato de fosfatasa alcalina PNPP y se mide a 405 nm utilizando un lector de microplacas.

La exploración primaria de los clones de scFv se hizo mediante ELISA en células de LLC primarias contra CMSP de ser humano normales. Los clones que fueron positivos en células de LLC y negativos en CMSP normales se reexploraron mediante ELISA en linfocitos B de ser humano normales, líneas de linfocitos B de ser humano, células TF-1, y la línea celular CLL-AAT. También se reexploraron los clones mediante ELISA en células de LLC aisladas a partir de tres pacientes distintos, para eliminar los clones que reconocían pacientes específicos o antígenos específicos de tipo sanguíneo. En las Figuras 2-6 se muestran los resultados de los ELISA representativos, y se resumen en las Fig. 9A - 9C.

El número de clones de anticuerpos scFv exclusivos obtenidos se determinó mediante análisis de la huella de ADN y secuenciación. Los insertos de ADN de scFv se amplificaron a partir de los plásmidos mediante PCR y se sometieron a digestión con la enzima de restricción BstNI. Los fragmentos resultantes se separaron en un gel de agarosa al 4 % y se tiñeron con bromuro de etidio. Los clones con distintos patrones de fragmentos de restricción deben tener distintas secuencias de aminoácidos. Los clones con patrones idénticos probablemente tienen secuencias similares o idénticas. Los clones con huellas de ADN de BstNI exclusivos se analizaron adicionalmente mediante secuenciación de ADN. Se encontraron veinticinco secuencias distintas, las cuales pudieron agruparse en 16 grupos de anticuerpos con regiones determinantes de complementariedad estrechamente relacionadas (Figs. 9A-9C).

Caracterización de los anticuerpos scFv mediante citometría de flujo

Se analizaron las especificidades de unión de varios anticuerpos scFv mediante citometría de flujo de 3 colores (Fig. 7). Se tiñeron CMSP aisladas de donantes normales con anti CD5 conjugado a FITC y anti CD19 conjugado con PerCP. La tinción con el anticuerpo scFv se realizó utilizando anti HA conjugado a biotina como anticuerpo secundario y estreptavidina conjugada con PE. Se encontró que tres anticuerpos, scFv-2, scFv-3, y scFv-6, reconocen de forma específica la población de linfocitos B CD19⁺ (datos no mostrados). El cuarto anticuerpo, scFv-9, reconoció dos poblaciones celulares distintas: los linfocitos B CD19⁺ y un subconjunto de linfocitos T CD5⁺ (Fig. 7). La caracterización adicional del subconjunto de linfocitos T mostró que era una subpoblación de los linfocitos TH CD4⁺CD8⁻ (datos no mostrados).

Para determinar si los antígenos que reconocían los anticuerpos scFv se sobreexpresaban en células de LLC primarias, se tiñeron con scFv CMSP de cinco pacientes de LLC y de cinco donantes normales, y se compararon mediante citometría de flujo (Fig. 8 y Tabla 2). Mediante la comparación de las intensidades de fluorescencia medias de las poblaciones celulares positivas, se pudo determinar el nivel de expresión relativo de un antígeno en células de LLC contra células normales. Un anticuerpo, scFv-2, tiñó células de LLC de manera menos consistentemente intensa que las CMSP normales, mientras que scFv-3 y scFv-6 tiñeron células de LLC de forma consistentemente más brillante que las CMSP normales. El cuarto anticuerpo, scFv-9, tiñó dos de las cinco muestras de LLC de forma mucho más intensa que las CMSP normales, pero proporcionó solo una tinción moderadamente más brillante para las otras tres muestras de LLC (Fig. 8 y Tabla 2). Esto indica que los antígenos para scFv-3 y scFv-6 se sobreexpresan aproximadamente 1,4 veces en la mayoría sino en todos los tumores de LLC, mientras que scFv-9 se sobreexpresa de 3 a 6 veces en un subconjunto de tumores de LLC.

Los pacientes de LLC se pueden dividir en dos grupos aproximadamente iguales: aquellos con un mal pronóstico (tiempo de supervivencia media de 8 años) y aquellos con un pronóstico favorable (tiempo de supervivencia media de 26 años). Se han identificado varios identificadores de pronóstico no favorable para la LLC, de forma muy notable la presencia de genes VH que carecen de mutaciones somáticas y la presencia de un alto porcentaje de linfocitos B CD38⁺. Debido a que scFv-9 reconoce un antígeno que se sobreexpresa solamente en un subconjunto de pacientes de LLC, se buscó determinar si la sobreexpresión del antígeno de scFv-9 correlacionaba con el porcentaje de células CD38⁺ en muestras de sangre de diez pacientes de LLC (Fig. 11). Los resultados indican que la sobreexpresión del antígeno de scFv-9 y el porcentaje de células CD38⁺ son completamente independientes uno del otro.

Identificación de los antígenos que reconocen los anticuerpos scFv mediante inmunoprecipitación (IP) y espectrometría de masas (EM).

Para identificar los antígenos de estos anticuerpos, se utilizaron los scFv para inmunoprecipitar los antígenos a partir de lisados preparados de la fracción microsomal de células CLL-AAT con superficie celular biotinilada (Fig. 12). Los antígenos inmunoprecipitados se purificaron mediante SDS-PAGE y se identificaron mediante espectrometría de masas de ionización de desorción de láser asistida por matriz (MALDI-MS) o espectrometría de masas en tándem de nano-electropulverizador de HPLC de fase inversa microcapilar (μ LC/MS/MS) (datos no mostrados). ScFv-2 inmunoprecipitó un antígeno de 110 kd a partir de las células RL y CLL-AAT (Fig. 12). Este antígeno se identificó mediante MALDI-MS como el marcador específico de linfocitos B CD19. ScFv-3 y scFv-6 inmunoprecipitaron un antígeno de 45 kd a partir de células CLL-AAT (no mostrado). Este antígeno se identificó mediante MALDI-MS como CD23, el cual es un marcador conocido de células de LLC y linfocitos B activados. ScFv-9 inmunoprecipitó un antígeno de 50 kd a partir de células CLL-AAT (Fig. 12). Este antígeno se identificó mediante μ LC/MS/MS como OX-2/CD200, un marcador conocido de linfocitos B, linfocitos T CD4⁺, y timocitos. OX-2/CD200 también se expresa en algunas células no linfoides tales como neuronas y células endoteliales.

EJEMPLO 3

La habilidad de las células que sobreexpresan OX-2/CD200 para cambiar la respuesta de citocinas de una respuesta Th1 (IL-2, IFN- γ) a una respuesta Th2 (IL-4, IL-10) se evaluó en una reacción de linfocitos mixta, utilizando macrófagos/células dendríticas derivadas de monocitos de un donante y linfocitos T obtenidos de sangre de un donante distinto. Como una fuente de células que expresan OX-2/CD200, se utilizaron células EBNA transfectadas con OX-2/CD200 según se describe a continuación o muestras de pacientes de LLC.

Transfección de células 293-EBNA

Se sembraron células 293-EBNA (Invitrogen) a $2,5 \times 10^6$ por placa de 100 mm. 24 horas más tarde las células se transfectaron de forma transitoria utilizando el reactivo Polyfect (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cotransfectaron las células con 7,2 μ g de ADNc de OX-2/CD200 en el vector pCEP4 (Invitrogen) y 0,8 μ g del vector pAdVantage (Promega). Como control negativo, se cotransfectaron células con el vector pCEP4 vacío más pAdVantage. 48 horas después de la transfección, aproximadamente el 90 % de las células expresaron OX-2/CD200 en su superficie, según se determinó mediante citometría de flujo con el anticuerpo scFv-9.

Maduración de células dendríticas/macrófagos a partir de monocitos sanguíneos

Se obtuvieron capas leucocitarias del San Diego Blood Bank y se aislaron los linfocitos de sangre primarios utilizando Ficoll. Las células se adhirieron durante 1 hora en Medio Esencial Mínimo de Eagles (EMEM) que contenía suero de ser humano al 2 % seguido de lavado vigoroso con PBS. Las células se cultivaron durante 5 días con GM-CSF, IL-4 e IFN- γ o M-CSF con o sin la adición de lipopolisacárido (LPS) después de 3 días. Se recolectaron las células maduras y se irradiaron a 2000 RAD utilizando un irradiador γ (irradiador Shepherd Mark I Modelo 30 (Cs137)).

Reacción de linfocitos mixta

Las reacciones de linfocitos mixtas se prepararon en placas de 24 pocillos utilizando 500.000 células dendríticas/macrófagos y 1×10^6 células respondedoras. Las células respondedoras eran linfocitos enriquecidos en linfocitos T purificados a partir de sangre periférica utilizando Ficoll. Los linfocitos T se enriquecieron mediante la incubación de las células durante 1 hora en matraces de cultivo de tejidos y tomando la fracción celular no adherente. Se añadieron 500.000 células EBNA transfectadas con OX-2/CD200 o células de LLC a los macrófagos/células dendríticas en presencia o ausencia de anticuerpo anti CD200 30 μ g/ml (scFv-9 convertido a IgG completa) 2-4 horas antes de la adición de los linfocitos. Los sobrenadantes se recolectaron después de las 48 y 68 horas y se analizó la presencia de citocinas.

Conversión de scFv-9 a IgG completa

Se amplificaron los genes V de la cadena ligera y la cadena pesada de scFv-9 mediante PCR solapante con cebadores que conectan la región variable de cada gen con el gen de la región constante de la cadena ligera lambda de ser humano, y el gen CH1 de la región constante de la cadena pesada de la IgG1 de ser humano, respectivamente. Se amplificaron las regiones variables del gen de la cadena ligera y del gen de la cadena pesada de scFv-9 con cebadores específicos y el gen de la región constante de la cadena ligera lambda de ser humano y el gen CH1 de la región constante de la cadena pesada de la IgG1 se amplificaron de forma separada con cebadores específicos como sigue:

R9VL-F1 QP: 5' GGC CTC TAG ACA GCC TGT GCT GAC TCA GTC
GCC CTC 3' (SEQ ID NO: 103);

R9VL/hCL2-rev: 5' CGA GGG GGC AGC CTT GGG CTG ACC TGT
GAC GGT CAG CTG GGT C 3' (SEQ ID NO: 104);

R9VL/hCL2-F: 5' GAC CCA GCT GAC CGT CAC AGG TCA GCC
CAA GGC TGC CCC CTC G 3' (SEQ ID NO: 105);

R9VH-F1: 5' TCT AAT CTC GAG CAG CAG CAG CTG ATG GAG
TCC G 3' (SEQ ID NO: 106);

R9VH/hCG-rev: 5' GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA
GGA GAC GGT GAC CAG GGT GC 3' (SEQ ID NO: 107);

R9VH/hCG-F: 5' GCA CCC TGG TCA CCG TCT CCT CAG CCT CCA
CCA AGG GCC CAT CGG TC 3' (SEQ ID NO: 108);

hCL2-rev: 5' CCA CTG TCA GAG CTC CCG GGT AGA AGT C 3' (SEQ ID NO: 109);

hCG-rev: 5' GTC ACC GGT TCG GGG AAG TAG TC 3' (SEQ ID NO: 110).

Los productos amplificados se purificaron y se realizó la PCR solapante.

Los productos finales se sometieron a digestión con Xba I/Sac I (cadena ligera) y Xho I/Pin AI (cadena pesada) y se clonaron en un vector de expresión de Fab de ser humano, PAX243hGL (véase la Solicitud Internacional publicada WO 2004/078937, la divulgación de la cual se incorpora en el presente documento mediante esta referencia). Los errores de PCR se analizaron en los clones de ADN mediante secuenciación de ADN. El gen del promotor hCMV IE se insertó en el sitio Not I/ Xho I (enfrente de la cadena pesada). El vector se sometió a digestión con Xba I/Pin AI/Eco I/Nhe I y se transfirió un fragmento de 3.472 pb que contenía la cadena ligera más el promotor hCMV IE y el gen de la cadena pesada a un vector de expresión de IgG1 en el sitio Xba I/Pin AI.

Análisis de citocinas

Se determinó el efecto del scFv-9 convertido a IgG completa sobre el perfil de citocinas en la reacción de linfocitos mixta.

Las citocinas tales como IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-6 encontradas en el sobrenadante del cultivo tisular se cuantificaron utilizando ELISA. Los pares de anticuerpos emparejados de captura y de detección para cada citocina se obtuvieron de R+D SysteEM (Minneapolis, MN), y se produjo una curva estándar para cada citocina utilizando citocina de ser humano recombinante. El anticuerpo de captura anti citocina se recubrió en la placa en PBS a la concentración óptima. Después de la incubación durante una noche, las placas se lavaron y bloquearon durante 1 hora con PBS que contenía BSA al 1 % y sacarosa al 5 %. Después de 3 lavados con PBS que contenía Tween al 0,05 %, los sobrenadantes se añadieron en diluciones al doble o al décimo en PBS que contenía BSA al 1 %. Las citocinas capturadas se detectaron con el anticuerpo anti citocina biotilado apropiado seguido de la adición de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina y sustrato SigmaS. El desarrollo del color se evaluó con un lector de placas de ELISA (Molecular Devices).

Como se muestra en la Figura 14, la presencia de células transfectadas con OX-2/CD200 pero no la de las células no transfectadas, dio como resultado una regulación negativa de las citocinas Th1 tales como IL-2 e IFN- γ . La adición del anticuerpo anti CD200 a 30 μ g/ml restableció de forma completa la respuesta Th1, lo que indica que el anticuerpo bloqueó la interacción de OX-2/CD200 con su receptor.

Como se indica en las Figuras 15 y 16, la presencia de células de LLC en una reacción de linfocitos mixta dio como resultado una regulación negativa de la respuesta Th1. (La Figura 15 muestra los resultados para IL-2; la Figura 16 muestra los resultados para IFN- γ). Este no solo fue el caso para las células que sobreexpresaban OX-2/CD200 (IB, EM, HS, BH), sino también para las células de LLC que no sobreexpresaban OX-2/CD200 (JR, JG y GB) (los niveles de expresión para estas células se indican en la Figura 11). Sin embargo, el anticuerpo anti CD200 solo estableció la respuesta Th1 en células que sobreexpresaban OX-2/CD200, lo que indica que para los pacientes que sobreexpresan OX-2/CD200, la anulación de la interacción de OX-2/CD200 con su receptor en macrófagos fue suficiente para restablecer una respuesta Th1. En pacientes que no sobreexpresaban OX-2/CD200 parecían estar implicados otros mecanismos en la regulación negativa de la respuesta Th1.

Modelos animales para analizar un efecto del anti CD200 sobre el rechazo de tumor

Se estableció un modelo en el cual se evitó el crecimiento tumoral del linfoma RAJI mediante la inyección simultánea de LSP. Ratones NOD/SCID se inyectaron por vía subcutánea con 4×10^6 células RAJI en presencia o ausencia de LSP de ser humano de distintos donantes a 1×10^6 , 5×10^6 o 10×10^6 células. Se determinó el largo y el ancho del tumor así como el peso corporal 3 veces por semana. En las Figuras 17 A y B se muestran las medias $\pm$ DE de los volúmenes tumorales para todos los grupos. Se realizaron los análisis estadísticos utilizando 2 pruebas paramétricas (prueba t de Student y prueba de Welch) y una prueba no paramétrica (la prueba de Wilcoxon). Los resultados de los análisis estadísticos se encuentran en la Figura 18. Las células RAJI forman tumores subcutáneos con variación aceptable. El rechazo depende del donante específico y del número de células LSP. 1×10^6 LSP fueron insuficientes para evitar el crecimiento tumoral. Los LSP del donante 2 a 5×10^6 desde el día 22-43 y los LSP del donante 3 a 5×10^6 o 1×10^7 comenzando en el día 36 redujeron de forma significativa el crecimiento tumoral. El donante 4 está muy próximo de ser significativo después del día 48.

Para analizar un efecto del anti CD200, las células RAJI se transfectan de forma estable con CD200. Los animales se inyectan como se describe en los párrafos anteriores. En presencia de células transfectadas con CD200, los tumores crecen incluso en presencia de LSP de ser humano. Se administra anticuerpo anti CD200 para evaluar el rechazo de tumor en este modelo.

También, se estableció un modelo de tumor líquido. Se inyectan por vía intraperitoneal células RAJI en ratones NOD/SCID. Las células se diseminan hacia la médula ósea, bazo, nódulo linfático y otros órganos lo que dio como resultado parálisis. La inyección concurrente de LSP de ser humano evita o desacelera el crecimiento tumoral. El crecimiento tumoral se controla mediante la evaluación de signos de dificultad en el movimiento y parálisis en los ratones. Una vez que los signos se observan, se sacrifican los ratones y el número de células tumorales se evalúa en diversos órganos incluyendo la médula ósea, el bazo, los nódulos linfáticos y la sangre mediante análisis de FACS y PCR.

De forma similar al modelo subcutáneo, las células transfectadas con CD200 se inyectaron por vía intraperitoneal. Estas crecieron incluso en presencia de LSP de ser humano. El tratamiento con anti CD200 dio como resultado el rechazo del tumor o un crecimiento tumoral más desacelerado.

EJEMPLO 4

Construcción de la biblioteca

De forma alternativa, se inmunizó un ratón con baculovirus que expresaba el dominio intracelular CD200 recombinante fusionado al Fc de IgG de ratón (CD200-Fc) (Obigen Inc., San Diego, CA) y células 293-EBNA transfectadas de forma transitoria con un vector que contenía CD200 de longitud completa. Se preparó ARN total a partir de bazo de ratón utilizando el reactivo TRI (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se purificó el ARN mensajero (ARNm) utilizando Oligotex (QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo con el manual del fabricante. Se sintetizó la primera hebra de ADNc utilizando la RTasa de SuperScript II (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se sometió a digestión la primera hebra del ADNc con endonucleasa de restricción y se sintetizó la segunda hebra de ADNc de acuerdo con el método descrito completamente y publicado en la solicitud PCT WO03/025202A2, publicada el 27 de marzo de 2003. Se limpió la segunda hebra de ADNc con el kit de purificación de PCR (QIAGEN) y se realizó la amplificación de cebador único de acuerdo con el método descrito en la solicitud publicada PCT WO03/025202A2, publicada el 27 de marzo de 2003. Los productos amplificados se agruparon y purificaron con el kit de purificación de PCR. Se sometió a digestión la cadena ligera Kappa con Xba I y BspE I, y las cadenas pesadas de IgG1 e IgG2a se sometieron a digestión con Xho I y Bln I. Los fragmentos digeridos se purificaron a partir del gel de agarosa utilizando el kit de extracción de Gel (QIAGEN) y se clonaron en el vector PAX313m/hG como se describe en la solicitud publicada PCT WO/04078937A2 publicada el 16 de septiembre de 2004.

Selección de bibliotecas

Las bibliotecas (kappa de IgG1 y kappa de IgG2a) se seleccionaron sobre CD200-Fc recubierto de forma directa en los pocillos de microtitulación (Costar Group, Bethesda, MD) o se capturaron con anticuerpo específico anti Fc de IgG de ratón en cabra (Sigma-Aldrich Cop., St Louis, MO). Para la preparación del fago de la biblioteca, se electroporaron células XL1-Blue electrocompetentes (Stratagene, La Jolla, CA) con ADN de la biblioteca y se crecieron en medio SOC durante 1 hora y en medio SB durante 2 horas con carbenicilina. La producción de fagos se indujo con la adición del fago auxiliar VCS M13 (Amersham Biosciences Cop., Piscataway, NJ) e IPTG 1 mM a 30 °C durante una noche. El cultivo se centrifugó y se precipitó el fago con polietilenglicol al 4 % y NaCl al 3 %. El fago se se centrifugó y se resuspendió en BSA al 1 %/PBS que contenía antígeno no relacionado, FLJ32028 que también se expresa en baculovirus fusionado en el extremo extracelular al Fc de IgG de ratón (FLJ32028-Fc) (Obigen, San Diego), como un competidor soluble. Para la selección sobre CD200-Fc recubierto de forma directa, cuatro pocillos se recubrieron con 100 µl de CD200-Fc (5 µg/ml en NaHCO₃ 0,1 M pH 8,6) a 4 °C durante una noche. Los pocillos se lavaron 5 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,0 y se bloquearon con seroalbúmina bovina (BSA) al 1 %/PBS a 37 °C durante 1 hora. Para la selección sobre CD200-Fc capturado sobre anti Fc de IgG de ratón en cabra, se recubrieron cuatro pocillos de microtitulación con 100 µl de anti Fc de IgG de ratón en cabra (20 µg/ml en PBS) a 4 °C durante una noche. Se lavaron los pocillos 5 veces con PBS y se incubaron con 100 µl de CD200-Fc (20 µg/ml en PBS) durante 1 hora a 37 °C. Se lavaron los pocillos 5 veces con PBS y se bloquearon con BSA al 1 %/PBS a 37 °C durante 1 hora. Para ambos métodos de selección, recubierto de forma directa y capturado, el bloqueante se reemplazó con la mezcla de los Fab solubles obtenidos a partir de la selección de otra biblioteca (la biblioteca descrita en el Ejemplo 3 de la solicitud PCT n.º de serie PCT/US04/17118 presentada el 2 de junio de 2004 (todavía no publicada), la divulgación entera de la cual se incorpora en el presente documento mediante esta referencia) sobre FLJ32028 para enmascarar epítomos en el Fc de IgG de ratón y los pocillos se incubaron durante 30 min a 37 °C. Se demostró que estos Fabs enmascarantes también se unen a CD200-Fc. Se añadió el fago de la biblioteca sobre los Fab enmascarantes y los pocillos se incubaron durante aproximadamente 1,5 horas a 37 °C. Los fagos no unidos se lavaron con PBS son rigurosidad creciente (3 veces en la primera ronda, 5 veces en la 2ª ronda y 10 veces en las 3ª y 4ª rondas) con 5 minutos de incubación y el pipeteo hacia arriba y hacia abajo 5 veces para cada lavado. El fago unido se eluyó dos veces con 100 µl de HCl 0,1 M con BSA 1 mg/ml, pH 2,2 y se neutralizó con Tris Base 2 M pH 11,5. Las células ER2738 recientemente crecidas se infectaron con el fago eluido y se titularon sobre placas de LB agarosa que contenían carbenicilina y glucosa. Los fagos restantes se propagaron durante una noche a 30-37 °C con la adición del fago auxiliar VCS M13 e IPTG 1 mM para la próxima ronda de selección.

Exploración de bibliotecas

Se crecieron noventa y cinco colonias de placas de titulación de las rondas 3 y 4 en 1 ml de SB que contenía tetraciclina 12,5 µg/ml y carbenicilina 50 µg/ml durante aproximadamente 6 horas a 37 °C. Se añadieron los fagos auxiliares VCS M13 y el cultivo se incubó durante 2 horas a 37 °C. Se añadió IPTG 1 mM y kanamicina 70 µg/ml y la producción de Fab-fago se indujo a 30 °C durante una noche. Los pocillos de microtitulación se recubrieron con 50 µl de anti F(ab')₂ de IgG de ratón en conejo (4 µg/ml en PBS), CD200-Fc (4 µg/ml en NaHCO₃ 0,1 M pH 8,6), o FLJ32028-Fc (4 µg/ml en NaHCO₃ 0,1 M pH 8,6) a 4 °C durante una noche. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon con 100 µl de BSA al 1 %/PBS durante 1 hora a 37 °C. El cultivo se centrifugó. Se reemplazó el bloqueante con el sobrenadante de cultivo que contenía Fab-fago y los pocillos se incubaron durante 1,5-2 horas a 37 °C. Los Fab-fagos restantes se almacenaron a -80 °C para citometría de flujo. Las placas se lavaron 3 veces con PBS y se detectó la unión con 50 µl de anticuerpo anti F(ab')₂ de IgG de ratón en cabra conjugado a fosfatasa alcalina (FA) (Pierce) (1:500 en BSA al 1 %/PBS) durante 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS y se revelaron con sustrato AP (Sigma-Aldrich) en tampón pNPP. Casi todos los clones de la ronda 3 fueron de por sí positivos de forma específica para CD200 (Figs. 19A-D). También se exploraron los clones mediante análisis de citometría de flujo de alto rendimiento. Se alicuotaron cien microlitros de células 293 transfectadas de forma transitoria con CD200 (1 x 10⁵ células) en una placa de 96 pocillos (Costar). Se añadieron cincuenta microlitros de

Fab-fago a las células y se mezclaron mediante pipeteo y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con BSA al 1 %/PBS que contenía NaN_3 al 0,01 %. Las células se resuspendieron en 100 μl de anticuerpo anti IgG de ratón en cabra conjugado con PE (Sigma-Aldrich) en BSA al 1 %/PBS que contenía NaN_3 al 0,01 % y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con BSA al 1 %/PBS que contenía NaN_3 al 0,01 % y se resuspendieron en 200 μl de paraformaldehído al 1 % en PBS. En las Figs. 20A-D se muestran clones representativos que muestran unión positiva con células que expresan CD200.

Se analizaron las secuencias de ADN y se agruparon las secuencias de aminoácidos deducidas de la cadena pesada de acuerdo con la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) (Fig. 21A, B). Se dividieron en 17 grupos.

Ensayo de esfera fluorescente

Se seleccionaron 23 clones para análisis adicionales. Estos fueron cG2aR3B5, dG1R3A5, cG2aR3A2, dG2aR3B2, dG1R3A1, cG2aR3A1, cG2aR3B, dG1R3B, cG1R3A, cG1R3A, cG1R3A1, dG1R3B, dG1R3B, cG1R3C, dG2aR3C, dG2aR3A1, cG2aR3B, cG2aR3B, dG1R3B, cG2aR3B, cG2aR3C, dG1R3H, y dG2aR3A6. Se sometió a digestión con Spe I/Nhe I el ADN de los Fab seleccionados para retirar el gen III y la expresión y purificación de Fab soluble. Se evaluó la capacidad de los Fab purificados para bloquear la interacción de CD200 con su receptor (CD200R) en un ensayo de esfera fluorescente. Se recubrieron microesferas modificadas con carboxilato TransFluoSpheres (488/645) (Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies, Eugene, OR) con estreptavidina, seguido de un anticuerpo anti Fc de ser humano marcado con biotina y proteína CD200-Fc producida en baculovirus. Las células 293 se transfectaron de forma transitoria con CD200R. La expresión en la superficie celular se confirmó mediante análisis de FACS. Se preincubaron 1 millón de esferas recubiertas con CD200 con diversas cantidades de las Fab anti CD200 o de IgG quimérica, durante 10 minutos antes de la adición de 50.000 células transfectadas con CD200R. Después de una incubación de 30 minutos a 37 °C, las células se lavaron con tampón Tris que contenía BSA al 1 % y se analizaron utilizando un FACS Calibur. Las Fab c1A10, c2aB7, y d1A5 mostraron las mejores interacciones bloqueantes de CD200 y CD200R a 6,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fab (Fig. 22). En las Figs. 21A y/o B estos clones se denominan respectivamente como cG1R3A10, cG2aR3B7 y dG1R3A5.

Quimerización y conversión de IgG

Se seleccionaron seis anticuerpos para la quimerización y conversión de IgG (véase la Fig. 23). Estos fueron c1A10 (cG1R3A10), c2aA10 (cG2aR3A10), c2aB7 (cG2aR3B7), d1A5 (dG1R3A5), d1B5 (dG1R3B5), y d1B10 (dG1R3B10). Para la quimerización, se realizó la PCR solapante para conectar la región variable de la cadena kappa de ratón y la región constante de la cadena kappa de ser humano. Se amplificó la región variable de la cadena pesada de ratón con un cebador 3' que contiene una región constante de IgG1 de ser humano parcial y un sitio de clonación Apa I. Se clonaron los fragmentos de cadena kappa y los fragmentos de cadena pesada amplificados en el vector PAX243hGK (véase la Solicitud Internacional publicada WO 2004/078937), que contiene la región constante de IgG1 de ser humano, en Xba I/Not I para la cadena ligera kappa y Xho I/Apa I para el fragmento de cadena pesada. La unión del Fab quimérico a CD200 se confirmó mediante ELISA y citometría de flujo. Estos Fab quiméricos se convirtieron en IgG mediante la inserción de la secuencia del promotor temprano inmediato del citomegalovirus de ser humano (hCMV IE Pro) para la expresión de la cadena pesada en Not I/Xho I, después, la transferencia de la cadena ligera y la cadena pesada en un vector de expresión de IgG1 de ser humano en los sitios Xba I/Pin AI. Este vector tiene una secuencia hCMV IE Pro adicional aguas arriba del sitio Xba I para la expresión de la cadena ligera en células de mamífero. Las secuencias de ADN se confirmaron y se prepararon preparaciones de ADN a gran escala utilizando columnas HiSpeed Maxi prep (QIAGEN) para la transfección de células de mamífero. La transfección transitoria se realizó en células 293-EBNA utilizando Effectene (QIAGEN), de acuerdo con el protocolo del fabricante, con la adición del vector pAdVantage (Promega US, Madison, WI). La transfección estable de la línea celular se realizó en células NS0 utilizando Effectene de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de una transfección transitoria a pequeña escala, se analizó el sobrenadante del cultivo para cada anticuerpo mediante ELISA (Fig. 24). Después de una transfección transitoria a gran escala, cada IgG se purificó a partir del sobrenadante de cultivo mediante columna de afinidad anti F(ab')₂ de IgG de ser humano utilizando FPLC (Amersham Biosciences).

Se analizaron las IgG purificadas en un ensayo de inhibición de esferas como se describe para los Fab. Todos los anticuerpos dirigidos contra CD200 bloquearon muy bien la interacción receptor ligando, según se muestra a continuación en la Fig. 25.

Reacción de linfocitos mixta

Se evaluó si el bloqueo de la interacción de CD200 con su receptor también evita el cambio de citocinas de Th1 a Th2 observado en las reacciones de linfocitos mixtas en presencia de CD200. Se obtuvieron las capas leucocitarias del San Diego Blood Bank y se aislaron linfocitos de sangre primarios (LSP) utilizando Histopaque (Sigma-Aldrich). Las células se adhirieron durante 1 h en EMEM que contenía suero de ser humano al 2 % seguido de agitación vigorosa con PBS. Las células se cultivaron durante 5 días en presencia de GM-CSF, IL-4 e IFN- γ . Las células maduras se recolectaron y se irradiaron a 2.000 RAD utilizando un irradiador γ (University of California San Diego).

Se prepararon las reacciones de linfocitos mixtas en placas de 24 pocillos utilizando 500.000 células dendríticas y 1×10^6 células respondedoras. Las células respondedoras eran linfocitos enriquecidos en linfocitos T, purificados a partir de sangre periférica utilizando Histopaque. Los linfocitos T se enriquecieron mediante la incubación de las células durante 1 hora en matraces de cultivo tisular y tomando la fracción celular no adherente. Se añadieron a las células dendríticas quinientas mil células de LLC primarias irradiadas que expresaban CD200, en presencia o ausencia de diversas cantidades de anticuerpo anti CD200 2-4 horas antes de la adición de los linfocitos. Se recolectaron los sobrenadantes después de 48 y 68 horas y las citocinas tales como IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-6 se cuantificaron utilizando ELISA. Los pares emparejados de anticuerpo de captura y de detección para cada citocina se obtuvieron de R+D Systems (Minneapolis), y se produjo una curva estándar para cada citocina utilizando citocina de ser humano recombinante. Se recubrió el anticuerpo de captura anti citocina en la placa en PBS a la concentración óptima. Después de la incubación durante una noche, las placas se lavaron y se bloquearon durante 1 h con PBS que contenía BSA al 1 % y sacarosa al 5 %. Después de 3 lavados con PBS que contenía Tween al 0,05 %, los sobrenadantes se añadieron a las diluciones indicadas en PBS que contenía BSA al 1 %. Las citocinas capturadas se detectaron con el anticuerpo anti citocina biotinilado apropiado, seguido de la adición de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina y sustrato SigmaS. El desarrollo de color se evaluó mediante un lector de placas de ELISA (Molecular Devices Cop., Sunnyvale, CA). Como se muestra en las Fig. 26A y B, la presencia de células de LLC anuló de forma completa la producción de IFN-gamma y la mayoría de la producción de IL-2 observada en la reacción de linfocitos mixta. La presencia de cualquiera de los anticuerpos permitió la producción de estas citocinas Th1 (Fig. 26A y B). Por el contrario, en presencia de los anticuerpos la producción de IL-10 se reguló de forma negativa. (Véase la Fig. 26C).

Ensayo de citotoxicidad mediado por células dependiente de anticuerpos

Además, se evaluó la capacidad de los seis anticuerpos anti CD200 de ratón quiméricos para destruir células tumorales que expresan CD200 en un ensayo de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). Se marcaron células 293-EBNA transfectadas con CD200 con 100 μ Ci/millón de células en 0,5 ml de medio durante 1 h a 37 °C. Después de 3 lavados, se recontaron las células, se resuspendieron en medio (RPMI complementado con suero AB de ser humano al 10 %) a 0,2 millones/ml y se dispensaron 50 μ l (10.000 células/pocillo) por triplicado en una placa de 96 pocillos de fondo redondeado. Se dispensaron 20 μ l de anticuerpos anti CD200 en cada uno de los pocillos de tal manera que se consiguió una concentración final de 20 μ g/ml. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (células efectoras) en un gradiente de Ficoll, los glóbulos rojos se lisaron con cloruro de amonio, se lavaron y resuspendieron en medio de cultivo y se dispensaron en cada pocillo 50 μ l de células. Las placas del ensayo se centrifugaron (1.500 rpm/5 minutos/freno bajo) y se transfirieron al incubador de cultivos celulares. Después de 4 horas, las placas de ensayo se centrifugaron como antes. Se transfirieron 36 μ l de los sobrenadantes a picoplasmas y se mezclaron con 250 μ l de coctel microscint-20, y se colocaron en el agitador orbital durante 2 minutos y se leyeron en un contador Top. Como se ilustra en la Fig. 27, todos los anticuerpos de CD200 quiméricos de ratón produjeron niveles similares de lisis cuando se cultivaron con células positivas para CD200. No se observó lisis con las células negativas para CD200. Además, la extensión de la lisis fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) cuando se comparó con el anticuerpo de control de isotipo d2A6 (anticuerpo anti FLJ32028).

EJEMPLO 5

Modelo Raji/LSP

Se inyectaron s.c. ratones NOD.CB17-Prkdc^{scid} (Jackson Laboratory) con 200 μ l de RPMI que contenía 4×10^6 células RAJI (ATCC) junto con 0, 1, 5 o 10 millones de LSP. Se incluyeron nueve o diez ratones por grupo. Se aislaron LSP de 250 ml de cloruro de amonio entero. El crecimiento tumoral se controló tres veces por semana mediante la medición de la longitud y el ancho con un calibrador. Se calculó el volumen tumoral basándose en longitud x ancho x ancho/2.

Las diferencias entre los grupos que se inyectaron con LSP en comparación con el grupo que recibió células tumorales solamente, se analizaron mediante prueba t de Student para muestras independientes de 2 colas. Se observaron diferencias significativas en los grupos que recibieron 5 o 10 millones de LSP, pero no en el grupo que recibió 1 millón de LSP, desde el día 32 en adelante. Los datos mostrados en la Figura 28 son un ejemplo representativo de 10 experimentos utilizando distintos donantes de LSP.

Modelo de Namalwa LSP

Se inyectaron ratones NOD.CB 17-Prkdc^{scid} (Jackson Laboratory, Bar Harbo, Maine), con 200 μ l de RPMI s.c. que contenía 4×10^6 células Namalwa (ATCC) junto con 0,2 o 10 millones de LSP. Se incluyeron 9-10 ratones por grupo. Se aislaron LSP de 250 ml de sangre entera en un gradiente de histopaque seguido de la lisis de los glóbulos rojos utilizando cloruro de amonio al 0,9 %. Se controló el crecimiento tumoral tres veces a la semana mediante la medición de la longitud y el ancho con un calibrador. El volumen tumoral se calculó basándose en longitud x ancho x ancho/2.

La Figura 29 muestra las diferencias entre los grupos que se inyectaron con LSP en comparación con el grupo que recibió células tumorales solamente, analizado mediante la prueba t de Student para muestras independientes de 2 colas. Se observaron diferencias significativas en los grupos que recibieron 10 millones de LSP para ambos donantes, pero no en el grupo que recibió 2 millones de LSP, a partir del día 8 en adelante.

Creación de líneas celulares que expresan CD200 estables

Se generaron líneas celulares Raki y Namalwa que expresan CD200 estables utilizando el Sistema de Expresión Lentiviral Virapower (Invitrogen, Carlsbad, CA). Mediante RT-PCR se aisló un ADNc de CD200 a partir de células de LLC primarias utilizando el cebador directo 5'-GACAAGCTTGCAAGGATGGAGAGGCTGGTGA-3' (SEQ ID NO: 212) y el cebador inverso 5'-GACGGATCCGCCCTTTTCCTCTGCTTTTCTC-3' (SEQ ID NO: 213). El producto de PCR se clonó en el vector de entrada Gateway pCR8/GW/APO-TA, y se secuenciaron clones individuales. Los clones con la secuencia correcta se recombinaron en las orientaciones sentido y antisentido en los vectores lentivirales pLenti6/V5/DEST y pLenti6/UbC/V5/DEST, utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA). La diferencia principal entre estos dos vectores es el promotor utilizado para dirigir la expresión de CD200: pLenti6/V5/DEST contiene el promotor temprano inmediato de CMV de ser humano, mientras que pLenti6/UbC/V5/DEST contiene el promotor de la ubiquitina C de ser humano.

Se produjeron reservas lentivirales pseudotipadas de VSV-G, de alto título, mediante la cotransfección transitoria de células 293-FT, como recomendaba el fabricante. Las células Raji o Namalwa se transdujeron mediante la resuspensión de 10^6 células en 1 ml de medio de crecimiento que contenía polibreno 12 µg/ml y la adición de 1 ml de reserva lentiviral. Después de incubar las células durante una noche a 37 °C, se retiró el medio que contenía virus y se reemplazó con 4 ml de medio recién preparado. Dos días más tarde, mediante citometría de flujo se analizó la expresión de CD200 de las células infectadas. En todos los experimentos, $\geq$ al 70 % de las células fueron CD200⁺, mientras que CD200 no fue detectable en las líneas celulares parentales y en células transducidas con los virus de control negativo (CD200 antisentido).

Para aislar las líneas celulares clonales que sobreexpresan CD200, las células infectadas se seleccionaron con blasticidina durante 13 días. Las concentraciones de blasticidina utilizadas fueron de 6 µg/ml para las células Raji y de 2 µg/ml para las células Namalwa. Después se aislaron los clones estables mediante dilución límite de las células resistentes a blasticidina en placas de 96 pocillos. Los clones se exploraron en formato de 96 pocillos mediante citometría de flujo utilizando anti CD200 de ser humano en ratón conjugado con PE (clon MRC OX104, Serotec) y un BD FACSCalibur equipado con un muestreador de alto rendimiento. Después de la exploración de un total de 2.000 clones de Raji y 2.000 clones de Namalwa, aquellos clones con la mayor expresión de CD200 se expandieron para caracterización adicional utilizando técnicas convencionales.

Efecto inmunosupresor de CD200 en el modelo RAJI/LSP

De acuerdo con los métodos divulgados, se ha demostrado que CD200 está regulado de forma positiva en las células de LLC. La regulación positiva de esta molécula podría ser potencialmente inmunosupresora. Para analizar si las células cancerosas que expresan CD200 evitan que el sistema inmunitario erradique las células cancerosas, se infectaron células RAJI, que normalmente no expresan CD200, con un sistema de vector de lentivirus que codifica CD200 como se describe anteriormente. Se seleccionaron los clones RAJI que expresan de forma estable CD200. Como un control para asegurar que no había efecto de la infección del vector, también se seleccionaron clones que expresaban una forma inversa no funcional de CD200 (CD200^{inv}). Las células RAJI que expresaban CD200, CD200^{inv}, o las células RAJI parentales, se inyectaron por vía subcutánea en ratones NOD.CB17-Prkdc^{scid} mice. Se incluyeron los siguientes grupos en el estudio:

- grupo 1: 4×10^6 RAJI s.c.; 9 ratones
Este grupo se necesitó para asegurar que las células transducidas con lentivirus muestran crecimiento similar a las células parentales.
- grupo 2: 4×10^6 RAJICD200 s.c.; 9 ratones
Este grupo se necesitó para asegurar que las células transducidas con CD200 mostraban crecimiento similar que las células parentales. También, este grupo proporcionará el máximo crecimiento tumoral. Los grupos 3 y grupo 4 se compararon con este grupo.
- grupo 3: 4×10^6 RAJICD200 + 5×10^6 LSP s.c.; 9 ratones.
Este número de LSP ha mostrado reducir el crecimiento tumoral en algunos ratones en experimentos anteriores. El rechazo no es tan fuerte como con 10 millones de células, pero para determinar si CD200 puede afectar solo a cierto número de células, y 5×10^6 es la mínima cantidad de LSP que puede utilizarse para obtener rechazo; el rechazo debería evitarse mediante la presencia de CD200.

- grupo 4: 4 x 10⁶ RAJICD200 + 10x10⁶ LSP s.c.; 8 ratones
Este es el número óptimo de LSP para observar rechazo en el modelo RAJI/LSP.
El diseño fue que la expresión de CD200 evitaría este rechazo.
- grupo 5: 4x10⁶ RajiCD200inv s.c.; 9 ratones
Este grupo se necesitó para asegurar que las células transducidas con lentivirus muestran crecimiento similar al de las células parentales.
- grupo 6: 4x10⁶ RajiCD200inv + 2x10⁶ LSP s.c.; 9 ratones
Este número de LSP no debería dar como resultado un rechazo fuerte o la reducción del crecimiento tumoral. Este es el control positivo para el grupo 3 y el grupo 4 (crecimiento tumoral esperado máximo). Entonces, si no hay rechazo en este grupo, los LSP donantes se hiperactivaron para comenzar con lo que podría explicar la carencia de un efecto mediante CD200.
- grupo 7: 4 x 10⁶ RajiCD200inv + 5x10⁶ LSP s.c.; 9 ratones
Controla que cualquiera de los efectos observados en el grupo 3 de CD200 en realidad esté relacionado con D200 y no con la transducción de lentivirus.
- grupo 8: 4 x 10⁶ RajiCD200inv + 10x10⁶ LSP s.c.; 8 ratones
Controla que cualquiera de los efectos observados en el grupo 4 de CD200 en realidad esté relacionado con CD200 y no con la transducción de lentivirus.

Los animales se sacrificaron en el día 38 basándose en que los tumores alcanzaron un tamaño por encima de los límites aceptables. Se retiraron tumores de 4 animales/grupo. Se congelaron en OCT dos tumores/grupo, los otros dos se utilizaron para aislar células y analizar mediante FACS la expresión de CD200. Las Figuras 30(a-c) demuestran los resultados de este estudio.

A pesar de que las células RAJICD200 parecían crecer algo más lentamente, la diferencia de crecimiento entre las células transducidas y las parentales no alcanzó la significación estadística como se muestra en la Figura 30(a).

La presencia de los LSP ralentizó el crecimiento tumoral en hasta el 84 % cuando se inyectaron 5 o 10x10⁶ de LSP, a pesar de que en general 10x10⁶ LSP dio como resultado una reducción más fuerte a lo largo del tiempo en comparación con 5x10⁶ LSP. La reducción en el crecimiento en comparación con las células tumorales parentales fue significativa a partir del día 20 en adelante. 2x10⁶ LSP dieron como resultado una reducción significativa del crecimiento tumoral a partir del d22-d29, pero la reducción se superó en los últimos puntos temporales (Fig. 30(b)). Este estudio indicó que este donante particular rechaza las células tumorales RAJI muy fuertemente.

El crecimiento tumoral en los grupos que recibieron células RAJI que expresan CD200 y LSP no fue significativamente diferente del crecimiento tumoral en el grupo que recibió solamente células RAJI, a pesar de que los ratones que recibieron 10x10⁶ LSP mostraron una tendencia al crecimiento tumoral reducido, pero la diferencia no alcanzó la significación estadística en ningún punto de tiempo después de que los tumores alcanzaran los 100 mm³. Cada ratón en el grupo que recibió células RAJI y 5x10⁶ LSP desarrolló un segundo tumor, algunos ratones tan pronto como en el d7, aunque esto no se observó en ningún otro grupo. Para el análisis, el segundo tumor se añadió al primer tumor y el tamaño combinado se muestra en la Fig. 30(c).

Estos resultados indican que, en efecto, la expresión de CD200 en células tumorales no evita que el sistema inmunitario desacelere el crecimiento tumoral. Este estudio demuestra también la utilidad del modelo RAJI/LSP para evaluar componentes o moléculas inmunosupresores.

Efecto inmunosupresor de CD200 en el modelo Namalwa/LSP

También, para evaluar si los efectos observados en el modelo RAJI/LSP también se pueden observar en otros modelos tumorales, se infectaron células tumorales Namalwa con el sistema lentivirus CD200 y se seleccionaron clones estables. También se seleccionaron clones que expresaban una forma no funcional inversa de CD200 (CD200inv), como un control para asegurar que no hay efecto de la infección por el vector. Se inyectaron ratones NOD.CB17-Prkdc^{scid} de acuerdo con el siguiente esquema como se muestra en las Figuras 31(a)-(d):

- grupo 1: 4 x 10⁶ Namalwa s.c.; 9 ratones
Este grupo se necesitó para asegurar que las células transducidas con lentivirus muestran crecimiento similar al de las células parentales.
- grupo 2: 4 x 10⁶ Namalwa CD200 (1D12Ub) s.c.; 9 ratones
Este grupo se necesitó para asegurar que las células transducidas con CD200 mostraban crecimiento similar al de las células parentales. También, este grupo proporcionará el crecimiento tumoral máximo. El grupo 3 y el grupo 4 se compararon con este grupo.
- grupo 3: 4 x 10⁶ Namalwa CD200 (1D12Ub)+ 5x10⁶ LSP s.c.; 9 ratones
Este número de LSP ha mostrado en experimentos anteriores que reduce el crecimiento tumoral en algunos ratones. El rechazo no es tan fuerte como con 10 millones de células, pero si CD200 puede afectar solamente un determinado número de células, y este es el mínimo de LSP que podemos utilizar para obtener rechazo; el rechazo se evitará mediante la presencia CD200.
- grupo 4: 4 x 10⁶ Namalwa CD200 (1D12Ub) + 10x10⁶ LSP s.c.; 8 ratones
Este es el número óptimo de LSP para observar rechazo en el modelo Namalwa /LSP. Esto se hizo para mostrar que la expresión de CD200 evita este rechazo.
- grupo 5: 4 x 10⁶ Namalwa CD200inv (C5Ubinv) s.c.; 9 ratones
Este grupo se necesitó para asegurar que las células transducidas con lentivirus mostraban crecimiento similar que las células parentales.
- grupo 6: 4 x 10⁶ Namalwa CD200inv + 2x10⁶ LSP s.c.; 9 ratones
Este número de LSP no debería dar como resultado un rechazo fuerte de la reducción del crecimiento tumoral. Este es el control positivo para el grupo 3 y el grupo 4 (crecimiento tumoral esperado máximo). Si no hay rechazo en este grupo, entonces los LSP donantes se hiperactivaron para comenzar con lo que podría explicar la carencia de un efecto mediante CD200.
- grupo 7: 4 x 10⁶ Namalwa CD200inv + 5x10⁶ LSP s.c.; 9 ratones
Este grupo se necesitó como un control para detectar cualquiera de los efectos en el grupo 3 de CD200 que estuviera relacionado con CD200 y no con la transducción de lentivirus.
- grupo 8: 4 x 10⁶ Namalwa CD200inv + 10x10⁶ LSP s.c.; 8 ratones
Este grupo se necesitó como un control para detectar cualquier efecto en el grupo 4 de CD200 que estuviera relacionado con CD200 y no con la transducción de lentivirus.

El largo y el ancho del tumor se evaluaron tres veces/semana.

- 5 Todas las células tumorales dieron como resultado un crecimiento tumoral rápido. No hubo diferencia de crecimiento significativa entre las células transducidas y las parentales. El tumor crece de forma más agresiva que lo observado de forma previa, como se muestra en la Figura 31(a).

- 10 La Figura 31(b) muestra que la presencia de LSP que desacelera el crecimiento tumoral en aproximadamente el 50 %. Esta tendencia se observó a partir del d12 en adelante. Las diferencias en el grupo tratado con LSP contra los grupos que recibieron solo células tumorales son estadísticamente significativas (según se determinó mediante la prueba t de Student de 2 colas) en el d17 y d19, cuando se inyectaron 2 millones o 10 millones de LSP. La inyección de 5 millones de LSP dio como resultado la reducción del crecimiento tumoral, pero no alcanzó la significación.

- 15 El crecimiento tumoral en los grupos que recibieron células Namalwa que expresan CD200 y LSP, fue similar al crecimiento tumoral en el grupo que solamente recibió células Namalwa (Figura 31(c)).

Estos datos confirman que la expresión de CD200 en células tumorales evita la desaceleración del crecimiento tumoral mediante el sistema inmunitario del ser humano.

- 20 Bloqueo del efecto inmunosupresor de CD200 en el modelo RAJI/LSP mediante anticuerpos anti CD200

- 25 Para evaluar si los anticuerpos anti CD200 pueden bloquear el efecto inmunosupresor de CD200 expresado en células tumorales, se inyectaron células RAJI transducidas con CD200 s.c. en ratones NOD.CB 17-Prkdc<scid>, y se evaluó la capacidad de los LSP para reducir el crecimiento tumoral en presencia o ausencia de los anticuerpos anti CD200 quiméricos d1B5 y c2aB7 o de un anticuerpo de control que no se une a células tumorales (alxn4100). Los anticuerpos se administraron de forma inicial a 10 mg/kg o 2,5 mg/kg con las células tumorales, y después i.v. a las concentraciones indicadas a continuación, dos veces/semana. Se prepararon los siguientes grupos:

1. 4×10^6 RAJICD200; 10 ratones
2. 4×10^6 RAJICD200 + 5×10^6 LSP; 10 ratones
3. 4×10^6 RAJICD200 + 5×10^6 LSP + d1B5 100 mg/kg; 12 ratones
4. 4×10^6 RAJICD200 + 5×10^6 LSP + d1B5 20 mg/kg; 9 ratones
5. 4×10^6 RAJICD200 + 5×10^6 LSP + c2aB7 100 mg/kg; 11 ratones
6. 4×10^6 RAJICD200 + 5×10^6 LSP + c2aB7 20 mg/kg; 9 ratones
7. 4×10^6 RAJICD200 + 5×10^6 LSP + alxn4100 100 mg/kg; 9 ratones

Se midió la longitud y el ancho del tumor 3 veces por semana, y se calculó el volumen del tumor mediante longitud*ancho*ancho/2 del tumor. La Figura 33 muestra que, como se esperaba, la expresión de CD200 en las células tumorales evita que las células inmunitarias reduzcan el crecimiento tumoral. Sin embargo, la adición de anticuerpos anti CD200 redujo el volumen tumoral en el 50-75 %. La reducción del crecimiento mediante los anticuerpos fue significativamente estadística a partir del día 18 hasta el final del estudio, según se determinó mediante la prueba t de Student y la prueba Mann Whitney. Por el contrario, el tratamiento con el anticuerpo de control no redujo el crecimiento tumoral. Estos datos demuestran la utilidad del anti CD200 en el tratamiento contra el cáncer. También, este estudio demuestra la utilidad del modelo RAJI/LSP para evaluar compuestos terapéuticos inmunomoduladores.

Bloqueo del efecto inmunosupresor de CD200 en el modelo Namalwa/LSP mediante anticuerpos anti CD200

Para evaluar si los efectos observados con los anticuerpos anti CD200 en el modelo RAJI/LSP también se pueden observar en otros modelos tumorales, se inyectaron s.c. células RAJI transducidas con CD200 en ratones NOD.CB17-Prkdc<scid>, y se evaluó la capacidad de los LSP para reducir el crecimiento tumoral en presencia o ausencia de los anticuerpos anti CD200 quiméricos d1B5 y c2aB7 o de un anticuerpo de control que no se une a células tumorales (alxn4100). Los anticuerpos a las concentraciones indicadas a continuación, se administraron de forma inicial con las células tumorales, y después dos veces/semana s.c. dentro de 0,5 cm del tumor. Se prepararon los siguientes grupos (10 ratones/grupo a menos que se indique lo contrario):

1. 4×10^6 NamalwaCD200
2. 4×10^6 NamalwaCD200 + 5×10^6 LSP; 12 ratones
3. 4×10^6 NamalwaCD200 + 5×10^6 LSP + d1B5 10 mg/kg; 12 ratones
4. 4×10^6 NamalwaCD200 + 5×10^6 LSP + d1B5 2,5 mg/kg
5. 4×10^6 NamalwaCD200 + 5×10^6 LSP + c2aB7 10 mg/kg; 12 ratones
6. 4×10^6 NamalwaCD200 + 5×10^6 LSP + c2aB7 2,5 mg/kg
7. 4×10^6 NamalwaCD200 + 5×10^6 LSP + alxn4100 10 mg/kg

Se midió el largo y el ancho del tumor 3 veces por semana, y el volumen tumoral se calculó mediante largo*ancho*ancho/2 del tumor. La Figura 34 muestra que, como se esperaba, la expresión de CD200 en las células tumorales evitó que las células inmunitarias redujeran el crecimiento tumoral. Sin embargo, la adición de anticuerpos anti CD200 redujo el volumen tumoral en hasta el 97 %. La reducción del crecimiento mediante los anticuerpos fue estadísticamente significativa a partir del día 12 hasta el final del estudio, según se determinó mediante la prueba t de Student y la prueba Mann Whitney. Por el contrario, el tratamiento con el anticuerpo de control no redujo el crecimiento tumoral. Estos datos confirman la utilidad del anti CD200 en el tratamiento contra el cáncer, y el uso de los modelos de tumor/LSP en la evaluación de productos terapéuticos inmunomoduladores.

Detección de un efecto inmunopotenciador potencial de los compuestos en el modelo RAJI/LSP

Se incubaron *in vitro* linfocitos T aislados de LSP utilizando columnas CD3 (Miltenyi) con una preparación de ascitis de AZND1 (anticuerpo anti DC-SIGN) o una preparación de ascitis de un anticuerpo de control (BB5). Se inyectaron ratones NOD.CB 17-Prkdc<scid> de acuerdo con el siguiente esquema:

- Grupo 6: 8 ratones, 4×10^6 RAJI + $0,8 \times 10^6$ linfocitos T potenciados con AZND1 + 2×10^6 LSP s.c.
 Grupo 5: 10 ratones, 4×10^6 RAJI s.c.
 Grupo 4: 8 ratones, 4×10^6 RAJI + 8×10^6 LSP s.c.
 Grupo 3: 8 ratones, 4×10^6 RAJI + $0,8 \times 10^6$ linfocitos T recién preparados s.c.
 Grupo 2: 8 ratones, 4×10^6 RAJI + $0,8 \times 10^6$ linfocitos T potenciados con AZND1 s.c.
 Grupo 1: 8 ratones, 4×10^6 RAJI + $0,8 \times 10^6$ linfocitos T potenciados con BB5.1 s.c.

Se midió el largo y el ancho del tumor 3 veces/semana.

Aunque los linfocitos T incubados con el control negativo BB5 no reducen el crecimiento tumoral, los linfocitos T tratados con AZND1 reducen el crecimiento tumoral de forma significativa (Véase, Figura 32).

Estos resultados demuestran que el modelo RAJI LSP se puede utilizar para evaluar la eficacia de componentes inmunopotenciadores.

EJEMPLO 6Determinación de la regulación positiva de CD200 en pacientes de LLC

5 Se tiñeron linfocitos de 15 pacientes de LLC con anti CD5 conjugado con FITC (e-bioscience), anti CD19 conjugado con APC (e-bioscience) y anti CD200 conjugado con PE (Serotec). Adecuadamente, se tiñeron linfocitos de donantes sanos. Se determinó la expresión de CD200 en células CD5+CD19+. Como se muestra en la Tabla a continuación, a pesar de que el nivel de expresión de CD200 varió entre muestras de pacientes de LLC, todas las muestras de LLC mostraron niveles elevados (intervalo de 1,6-4 veces) más altos de expresión de CD200 en comparación con la expresión de CD200 en linfocitos B normales. Se seleccionan pacientes de LLC que muestran niveles elevados de expresión de CD200 para el tratamiento anti CD200, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

15 Análisis de FACS de la expresión de CD200 en células de LLC-B en comparación con linfocitos B normales

Muestra de LLC		Donante sano	
ID del donante	CD200 de LLC-B (IFMG)	CD200 de B normales (IFMG)	Proporción (LLC/ B normales)
RC011731	93	58	1,6
RF020934	659	185	3,6
JA073031	334	64	5,2
GR011846	156	64	2,4
BB101735	420	95	4,4
DM6988172	290	97	2,9
MR8074020	403	97	4,2
CB8267677	300	97	3,1
GB 1325248	178	77(7)	2,3
VN7029373	154	77(7)	2,0
DG8942820	146	77(7)	1,9
MM8451869	237	77(7)	3,1
JR4539931	215	77(7)	2,8
HS6787771	305	77(7)	4,0
VB040439	123	41	3,0

MEDIA: 3,1
DE = 1,0

REFERENCIAS

- 1) Agarwal, *et al.*, (2003). Disregulated expression of the Th2 cytokine gene in patients with intraoral squamous cell carcinoma. *Immunol Invest* 32:17-30.
- 2) Almasri, NM *et al.* (1992). *Am J Hemato* 140 259-263.
- 3) Contasta, *et al.*, (2003). Passage from normal mucosa to adenoma and colon cancer: alteration of normal sCD30 mechanisms regulating TH1/TH2 cell functions. *Cancer Biother Radiopharm* 18:549-557.
- 4) Gorczynski, *et al.*, (1998). Increased expression of the novel molecule OX-2 is involved in prolongation of murine renal allograft survival. *Transplantation* 65:1106-1114.
- 5) Gorczynski, *et al.*, (2001). Evidence of a role for CD200 in regulation of immune rejection of leukaemic tumour cells in C57BL/6 mice. *Clin Exp Immunol* 126:220-229.
- 6) Hainsworth, JD (2000). *Oncologist* 2000;5(5):376-84.
- 7) Inagawa, *et al.*, (1998). Mechanisms by which chemotherapeutic agents augment the antitumor effects of tumor necrosis factor: involvement of the pattern shift of cytokines from Th2 to Th1 in tumor lesions. *Anticancer Res* 18:3957-3964.
- 8) Ito, *et al.*, (1999). Lung carcinoma: analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry. *Cancer* 85:2359-2367.
- 9) Kiani, *et al.*, (2003). Normal intrinsic Th1/Th2 balance in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia not treated with interferon-alpha or imatinib. *Haematologica* 88:754-761.

- 10) Lauerova, *et al.*, (2002). Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. *Neoplasma* 49:159-166.
- 11) Maggio, *et al.*, (2002). Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Ann Oncol* 13 Suppl 1:52-56.
- 5 12) Nilsson, K (1992). *Burn Cell*. 5(1):25-41.
- 13) Podhorecka, *et al.*, (2002). T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia-the three-color flow cytometry analysis. *Leuk Res* 26:657-660.
- 14) Pu, QQ y Bezwoda, W (2000). *Anticancer Res*. 20(4):2569- 78.
- 15) Smyth, *et al.*, (2003). Renal cell carcinoma induces prostaglandin E2 and T-helper type 2 cytokine production in peripheral blood mononuclear cells. *Ann Surg Oncol* 10:455-462.
- 10 16) Tatsumi, *et al.*, (2002). Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J Exp Med* 196:619-628.
- 17) Walls A V *et al.* (1989). *Int. J Cancer* 44:846-853.
- 18) Winter, *et al.*, (2003). Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies. *Immunology* 108:409-419.

Además, la invención divulga los siguientes puntos:

- 20 1. Un método para el tratamiento del cáncer que comprende:
administrar a un sujeto que padece cáncer una composición terapéutica que i) interfiere con la interacción entre CD200 y un receptor de CD200, inhibiendo de este modo el efecto supresor inmunitario de CD200 y ii) que destruye células cancerosas utilizando una molécula de fusión polipeptídica que incluye una porción que se une a OX-2/CD200 o a un receptor de OX-2/CD200.
- 25 2. Un método como en el punto 1, en el que la etapa de administración de una composición terapéutica comprende administrar un anticuerpo que se une a OX-2/CD200 al sujeto.
- 30 3. Un método como en el punto 1, en el que la etapa de administración de una composición terapéutica comprende administrar al sujeto un anticuerpo monoclonal que se une a OX-2/CD200.
4. Un método como en el punto 1, en el que la etapa de administración de una composición terapéutica comprende administrar al sujeto un anticuerpo que se une a OX-2/CD200.
- 35 5. Un método como en el punto 1, en el que la etapa de administración de una composición terapéutica comprende administrar al sujeto un anticuerpo monoclonal que se a un receptor de OX-2/CD200.
6. Un método como en el punto 1, en el que el sujeto aquejado de cáncer es un paciente de LLC.
- 40 7. Un método como en el punto 1, en el que la molécula de fusión comprende una toxina.
8. Un método como en el punto 1, en el que molécula de fusión comprende un emisor de radiación de alta energía.
9. Un método como en el punto 1, en el que la molécula de fusión comprende una citocina o quimiocina que potencia la actividad de linfocitos T citotóxicos o de células NK.
- 45 10. Un método como en el punto 1, en el que la molécula de fusión comprende una quimiocina que atrae linfocitos T.
11. Un método para el tratamiento del cáncer que comprende la administración de un anticuerpo que se une a CD200 en el que a) la interacción entre CD200 y su receptor está bloqueada y b) se destruyen células cancerosas que expresan CD200.
- 50 12. Un método para el tratamiento del cáncer que comprende la administración de un anticuerpo que se une a CD200 en el que a) la interacción entre CD200 y su receptor está bloqueada y b) la actividad de linfocitos T citotóxicos o de células NK contra el cáncer está potenciada.
- 55 13. Un método para el tratamiento del cáncer como en el punto 12, en el que la potenciación de la actividad de los linfocitos T citotóxicos o las células NK se consigue mediante un anticuerpo que se une a CD200, fusionado con una citosina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-12, IL-18, IL-13, e IL-5.
- 60 14. Un método para el tratamiento del cáncer que comprende y administra un anticuerpo que se une a CD200 en el que a) la interacción entre CD200 y su receptor está bloqueada y b) los linfocitos T son atraídos hacia las células tumorales.

15. Un método para el tratamiento del cáncer como en el punto 14, en el que la atracción de linfocitos T se consigue mediante un anticuerpo que se une a CD200, fusionado con una quimiocina seleccionada del grupo que consiste en MIG, IP-10 e I-TAC.
- 5 16. Una molécula de fusión que comprende:
una primera porción que se dirige a células que portan el antígeno OX-2/CD200; y
una segunda porción que promueve la muerte de las células.
- 10 17. Una molécula de fusión como en el punto 16, en la que la primera porción comprende un anticuerpo que se une a OX-2/CD200.
18. Una molécula de fusión como en el punto 16 en el que la primera porción comprende un anticuerpo monoclonal que se une a OX-2/CD200.
- 15 19. Un método para el tratamiento del cáncer que comprende:
administrar a un paciente de cáncer un anticuerpo que (i) interfiere con la interacción de CD200 y un receptor de CD200, inhibiendo de este modo el efecto supresor inmunitario de CD200 y (ii) destruye células cancerosas a través de citotoxicidad celular mediada por el complemento o de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- 20 20. Un anticuerpo que (i) interfiere con la interacción de CD200 y un receptor de CD200, inhibiendo de este modo el efecto supresor inmunitario de CD200 y (ii) destruye células cancerosas a través de la citotoxicidad celular mediada por el complemento o de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- 25 21. Una composición que comprende un anticuerpo del punto 20 y un transportador farmacéuticamente aceptable.
22. Un método como en el punto 1, en el que la etapa de administrar una composición terapéutica comprende administrar un anticuerpo que comprende una región CDR1 de cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 5, 12 y 13.
- 30 23. Un método como en el punto 1, en el que la etapa de administrar una composición terapéutica comprende administrar un anticuerpo que comprende una región CDR2 de cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 21 y 23.
- 35 24. Un método como en el punto 1, en el que la etapa de administrar una composición terapéutica comprende administrar un anticuerpo que comprende una región CDR3 de cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 29, 37 y 38.
- 40 25. Un método como en el punto 1, en el que la etapa de administrar una composición terapéutica comprende administrar un anticuerpo que comprende una región CDR1 de cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 50, 55 y 56.
- 45 26. Un método como en el punto 1, en el que la etapa de administrar una composición terapéutica comprende administrar un anticuerpo que comprende una región CDR2 de cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 69, 74 y 75.
27. Un método como en el punto 1, en el que la etapa de administrar una composición terapéutica comprende administrar un anticuerpo que comprende una región CDR3 de cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 88, 93 y 94.
- 50 28. Una molécula de fusión como en el punto 16, en el que la primera porción comprende un polipéptido que comprende una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 5, 12, 13, 21, 23, 29, 37, 38, 50, 55, 56, 69, 74, 75, 88, 93 y 94.
- 55 29. Un método como en cualquiera de los puntos 2-5, en el que la composición terapéutica comprende un anticuerpo humanizado.
30. Un método como en cualquiera de los puntos 2-5, en el que la composición terapéutica comprende un Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.
- 60 31. Un método como en cualquiera de los puntos 11-15, en el que el anticuerpo comprende un anticuerpo humanizado.
- 65 32. Un método como en cualquiera de los puntos 11-15, en el que el anticuerpo comprende un Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.

33. Una molécula de fusión como en cualquiera de los puntos 17-18, en la que el anticuerpo comprende un anticuerpo humanizado.
- 5 34. Una molécula de fusión como en cualquiera de los puntos 17-18, en la que al anticuerpo comprende un Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.
35. Un método como en cualquiera de los puntos 22-27, en el que la composición terapéutica comprende un anticuerpo humanizado.
- 10 36. Un método como en cualquiera de los puntos 22-27, en el que la composición terapéutica comprende un Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.
37. Una composición como en el punto 21, en el que el anticuerpo comprende un anticuerpo humanizado.
- 15 38. Una composición como en el punto 21, en el que el anticuerpo comprende un Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.
39. Una molécula de fusión como en el punto 28, en el que el polipéptido comprende un anticuerpo humanizado.
- 20 40. Una molécula de fusión como en el punto 28, en el que el polipéptido comprende un Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.
41. Un anticuerpo que se une a una célula que expresa CD200 que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 111 - 199.
- 25 42. Un anticuerpo como en el punto 41, que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 111, 114, 118, 133, 136, 140, 141, 149, 155, 162, 163, 165, 174, 181, 187, 188, 189, 195 y 199.
43. Un anticuerpo como en el punto 41, que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 200-211.
- 30 44. Un anticuerpo como en el punto 41, en el que el anticuerpo comprende un anticuerpo humanizado.
45. Un anticuerpo como en el punto 41, en el que el anticuerpo comprende Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.
- 35 46. Un método para el tratamiento del cáncer que comprende:
administrar a un sujeto aquejado de cáncer una composición terapéutica que contiene un anticuerpo que se une a una célula que expresa CD200, estando el anticuerpo presente en una cantidad suficiente para promover la producción de una o más citocinas Th1.
- 40 47. Un método como en el punto 46, en el que el anticuerpo comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 111 - 199.
- 45 48. Un método como en el punto 46, en el que el anticuerpo comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 111, 114, 118, 133, 136, 140, 141, 149, 155, 162, 163, 165, 174, 181, 187, 188, 189, 195 y 199.
49. Un método como en el punto 46, en el que el anticuerpo comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 200-211.
- 50 50. Un método como en el punto 46, en el que el anticuerpo comprende un anticuerpo humanizado.
51. Un método como en el punto 46, en el que el anticuerpo comprende un Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.
- 55 52. Un método como en el punto 46, en el que el cáncer es LLC.
53. Un método de destrucción de células tumorales que comprende:
administrar un sujeto aquejado de cáncer una composición terapéutica que contiene un anticuerpo que se une a una célula que expresa CD200, estando presente el anticuerpo en una cantidad suficiente para provocar citotoxicidad dependientes de anticuerpos mediada por células.
- 60 54. Un método como en el punto 53, en el que el anticuerpo comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 111 - 199.
- 65

55. Un método como en el punto 53, en el que el anticuerpo comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 111, 114, 118, 133, 136, 140, 141, 149, 155, 162, 163, 165, 174, 181, 187, 188, 189, 195 y 199.
- 5 56. Un método como en el punto 53, en el que el anticuerpo comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 200-211.
57. Un método como en el punto 53, en el que el anticuerpo comprende un anticuerpo humanizado.
- 10 58. Un método como en el punto 53, en el que el anticuerpo comprende un Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.
59. Un método como en el punto 53, en el que el cáncer es LLC.
60. Una molécula de fusión que comprende:
- 15 una primera porción que se dirige células que portan el antígeno OX-2/CD200, comprendiendo la primera porción una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 111 - 199; y una segunda porción que promueve la muerte de las células.
- 20 61. Una molécula de fusión como en el punto 60, en la que la primera porción comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 111, 114, 118, 133, 136, 140, 141, 149, 155, 162, 163, 165, 174, 181, 187, 188, 189, 195 y 199.
- 25 62. Una molécula de fusión como en el punto 61, en la que la primera porción comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 200-211.
63. Una composición que comprende un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 111 - 199 y un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 30 64. Una composición como en el punto 63, en la que el anticuerpo comprende un anticuerpo humanizado.
65. Una composición como en el punto 63, en la que el anticuerpo comprende un Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.
66. Un método para el tratamiento del cáncer que comprende:
- 35 administrar a un sujeto aquejado de cáncer una composición terapéutica que contiene un anticuerpo que se une a una célula que expresa CD200, estando presente el anticuerpo en una cantidad suficiente para promover la producción de una o más citocinas Th1 y para provocar citotoxicidad celular mediada por el complemento o dependiente de anticuerpos.
- 40 67. Un anticuerpo quimérico que se une a una célula que expresa CD200 que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 200-211.
68. Un método que comprende:
- 45 determinar si OX-2/CD200 está regulada de forma positiva en un sujeto; y administrar al sujeto una terapia que potencia la respuesta inmunitaria.
69. Un método como en el punto 68, en el que la terapia comprende administrar un polipéptido que se une a OX-2/CD200 o a un receptor de OX-2/CD200, siendo administrado el polipéptido en una cantidad eficaz para inhibir el efecto inmunosupresor de OX-2/CD200.
- 50 70. Un método como en el punto 68, en el que el sujeto es un paciente de cáncer.
71. Un método como en el punto 68, en el que el sujeto es un paciente de LLC.
72. Un método como en el punto 69, en el que el polipéptido comprende un anticuerpo.
73. Un método como en el punto 69, en el que el polipéptido comprende un anticuerpo humanizado.
- 60 74. Un método como en el punto 69, en el que el polipéptido comprende un Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂.
75. Un método como en el punto 68, en el que la etapa de determinar si OX-2/CD200 está regulada de forma positiva en un sujeto comprende:
- 65 obtener tejido de un paciente de cáncer;

evaluar si los niveles de CD200 están por lo menos 2 veces por encima de los niveles encontrados en los tejidos normales correspondientes.

- 5 76. Un método como en el punto 75, en el que el tejido obtenido a partir del paciente de cáncer es sangre.
77. Un método como en el punto 75, en el que se obtiene tejido a partir de un paciente de cáncer mediante la realización de una biopsia.
- 10 78. Un método como en el punto 75, en el que los niveles de CD200 se evalúan mediante la realización de análisis de FACS utilizando anticuerpos anti CD200 en combinación con marcadores de células cancerosas.
79. Un método como en el punto 75, en el que el marcador de células cancerosas es CD38 o CD19.
- 15 80. Un método como en el punto 75, en el que el paciente está aquejado de un cáncer hematopoyético.
81. Un método como en el punto 75, en el que el paciente está aquejado de LLC.
- 20 82. Un método como en el punto 69, en el que la terapia comprende eliminar linfocitos T reguladores existentes antes de la administración de un polipéptido que se une a OX-2/CD200 o a un receptor de OX-2/CD200, siendo administrado el polipéptido en una cantidad eficaz para inhibir el efecto inmunosupresor de OX-2/CD200.
83. Un método como en el punto 82, en el que la terapia comprende administrar un linfocito T regulador que elimina la cantidad de un reactivo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti CD25 y ciclofosfamida.
- 25 84. Un método como en el punto 69, en el que la terapia comprende adicionalmente administrar una terapia mieloablativa.
85. Un método como en el punto 84, en el que la terapia comprende adicionalmente un trasplante de médula ósea.
- 30 86. Un método como en el punto 84, en el que la terapia comprende adicionalmente una transferencia de linfocitos T reactivos de LLC.
87. Un método como en el punto 69, en el que la terapia comprende adicionalmente administrar una vacuna contra el cáncer.
- 35 88. Un método como en el punto 87, en el que la vacuna contra el cáncer se selecciona al grupo que consiste en células dendríticas cargadas con células de LLC o proteínas, péptidos o ARN obtenidos de células dendríticas cargadas con células de LLC, proteínas de choque término obtenidas de pacientes, péptidos tumorales y proteínas tumorales.
- 40 89. Un método como en el punto 69, en el que la terapia comprende adicionalmente administrar una cantidad inmunoestimulante eficaz de un compuesto inmunoestimulante.
- 45 90. Un método como en el punto 89, en el que el compuesto inmunoestimulante se selecciona del grupo que consiste en CpG, agonistas del receptor similar a toll y anticuerpos anti CTLA 4.
91. Un método como en el punto 69, en el que la terapia comprende adicionalmente administrar una cantidad bloqueante inmunosupresora eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti PDL1, anticuerpos anti PDL1, anticuerpos anti IL-10 y anticuerpos anti IL-6.
- 50 92. Un método como en el punto 69, en el que la terapia comprende administrar una cantidad eficaz de un agente capaz de bloquear la regulación negativa de los linfocitos T o de las células presentadoras de antígeno.
93. Un método como en el punto 92, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti CTLA4, anticuerpos anti PD-L1, anticuerpos anti PDL-2 y anticuerpos anti PD-1.
- 55 94. Un método como en el punto 69, en el que la terapia comprende administrar una cantidad eficaz de un agente capaz de potenciar la coestimulación positiva de linfocitos T.
- 60 95. Un método como en el punto 94, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti CD40 y anticuerpos anti 4-1BB.
96. Un método como en el punto 69, en el que la terapia comprende administrar una vacuna contra el cáncer.
- 65 97. Un método como en el punto 96, en el que la vacuna contra el cáncer se selecciona del grupo que consiste en células dendríticas cargadas con células o proteínas de LLC, péptidos o ARN obtenidos de células dendríticas

cargadas con células de LLC, proteínas de choque térmico obtenidas de pacientes, péptidos tumorales o proteínas tumorales.

98. Un método como en el punto 69, en el que la terapia comprende la administración de una cantidad eficaz de un agente capaz de activar los receptores del sistema inmunitario innato.

99. Un método como en el punto 98, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en CpG, Luivac, Biostim, Ribominy, Imudon y Bronchovaxom.

100. Un método como en el punto 69, en el que la terapia comprende administrar una cantidad inmunopotenciadora eficaz de una citocina.

101. Un método como en el punto 100, en el que la citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-2, GM-CSF e IFN-gamma.

102. Un método para controlar el progreso de un tratamiento terapéutico, comprendiendo el método:

administrar una terapia inmunomoduladora a un sujeto; y
determinar los niveles de OX-2/CD200 en un sujeto por lo menos dos veces, para determinar la eficacia de la terapia.

103. Un método como en el punto 102, en el que los niveles en un sujeto de OX-2/CD200 se determinan antes de la administración de la terapia inmunomoduladora y después los niveles en un sujeto de OX-2/CD200 se determinan después de por lo menos una administración de la terapia.

104. Un método como en el punto 102, que comprende adicionalmente la etapa de ajustar la cantidad o frecuencia de la dosificación de la terapia inmunomoduladora.

105. Un método como en el punto 102, en el que los niveles de OX-2/CD200 se determinan mediante la detección de un marcador que correlaciona con OX-2/CD200.

106. Un método de evaluación del efecto inmunomodulador de una molécula que expresan células cancerosas, que comprende:

administrar una molécula que se expresa de forma natural en células cancerosas, células cancerosas y linfocitos a un sujeto; y
controlar la tasa de crecimiento de las células cancerosas,
en el que la molécula se considera que tiene un efecto inmunomodulador cuando se observa cualquier cambio en la tasa de crecimiento de las células cancerosas en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos de donantes se administran solos.

107. Un método como en el punto 106, en el que la molécula se considera inmunopotenciadora, en la cual se observa una reducción en la tasa de crecimiento de las células cancerosas en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos de donantes se administran solos.

108. Un método como en el punto 106, en el que la molécula se considera inmunosupresora cuando se observa una tasa de crecimiento de las células cancerosas mayor, en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos de donantes se administran solos.

109. Un método como en el punto 106, en el que la molécula que expresa de forma natural una célula cancerosa se administra mediante la inyección de células que expresan de forma natural el compuesto.

110. Un método como en el punto 106, en el que la molécula que expresa de forma natural una célula cancerosa se administra mediante la inyección de células que se han modificado por ingeniería genética para expresar la molécula.

111. Un método como en el punto 106, que comprende adicionalmente identificar la molécula que expresan células cancerosas a partir de una base de datos.

112. Un método como en el punto 106, que comprende adicionalmente identificar la molécula que expresan células cancerosas de forma experimental.

113. El método del punto 106, en el que los linfocitos son de ser humano.

114. El método del punto 113, en el que los linfocitos de ser humano se seleccionan del grupo que consiste en linfocitos de sangre periférica (LSP), linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas.

115. El método del punto 106, en el que los linfocitos son linfocitos de sangre periférica (LSP) de ser humano.
116. El método del punto 106, en el que el número de linfocitos administrado es insuficiente para reducir la tasa de crecimiento de células cancerosas.
117. El método del punto 106, en el que el número de linfocitos administrado es menor que el número de células cancerosas administradas.
118. El método del punto 106, en el que el número de linfocitos administrado es desde aproximadamente 1 millón de células a aproximadamente 2 millones de células.
119. El método del punto 106, en el que el número de linfocitos administrado es suficiente para reducir la tasa de crecimiento de células cancerosas.
120. El método del punto 106, en el que el número de linfocitos administrado es mayor o igual al número de células cancerosas administradas.
121. El método del punto 106, en el que el número de linfocitos administrado es desde aproximadamente 5 millones de células a aproximadamente 10 millones de células.
122. El método del punto 106, en el que la administración de células cancerosas comprende la inyección en un sujeto de por lo menos una línea celular de linfoma seleccionada del grupo que consiste en RAJI y Namalwa.
123. El método del punto 106, en el que el sujeto es un ratón inmunodeficiente.
124. El método del punto 106, en el que el número de linfocitos administrado es suficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas y la molécula que expresan las células cancerosas se considera inmunosupresora cuando la tasa de crecimiento observada de las células cancerosas es mayor en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos se administran solos.
125. El método del punto 106, en el que el número de linfocitos administrado es insuficiente para desacelerar el crecimiento de las células cancerosas y la molécula que expresan las células cancerosas se considera inmunopotenciadora cuando la tasa de crecimiento de las células cancerosas observadas esta reducida en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos se administran solos.
126. El método como en el punto 106, que comprende determinar adicionalmente la tasa de crecimiento de las células cancerosas mediante la administración de linfocitos y de células cancerosas solos a un sujeto de control.
127. Un método como en el punto 106, que comprende adicionalmente determinar la tasa de crecimiento de las células cancerosas mediante la administración de linfocitos y de células cancerosas solos al sujeto, antes de la administración de la molécula que expresan las células cancerosas.
128. Un método de evaluación del efecto inmunomodulador de un compuesto, que comprende las etapas de:
 - administrar un compuesto a evaluar, células cancerosas y linfocitos a un sujeto; y
 - controlar la tasa de crecimiento de las células cancerosas,en el que el compuesto se considera que tiene un efecto inmunomodulador cuando se observa cualquier cambio en la tasa de crecimiento de la células cancerosas, en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos de donantes se administran solos.
129. El método del punto 128, en el que el compuesto se considera inmunopotenciador cuando se observa una reducción en la tasa de crecimiento de las células cancerosas, en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos de donantes se administran solos.
130. El método del punto 128, en el que el compuesto se considera inmunosupresor cuando la tasa de crecimiento de las células cancerosas en presencia del compuesto es mayor que la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos de donantes se administran solos.
131. El método del punto 128, en el que el compuesto a evaluar es un anticuerpo.
132. El método del punto 128, en el que la administración de células cancerosas comprende inyectar en un sujeto por lo menos una línea celular de linfoma seleccionada del grupo que consiste en RAJI y Namalwa.
133. El método del punto 128, en el que las células cancerosas administradas expresan una molécula inmunosupresora.

134. El método del punto 128, en el que las células cancerosas administradas expresan CD200.
135. El método del punto 128, en el que la expresión de CD200 se regula de forma positiva mediante las células cancerosas administradas.
136. El método del punto 128, en el que los linfocitos son de ser humano.
137. El método del punto 136, en el que los linfocitos de ser humano se seleccionan del grupo que consiste en linfocitos de sangre periférica (LSP), linfocitos T, linfocitos B, y células dendríticas.
138. El método del punto 128, en el que los linfocitos son linfocitos de sangre periférica (LSP) de ser humano.
139. El método del punto 138, en el que el número de LSP de ser humano administrado es menor que el número de células cancerosas administrado.
140. El método del punto 138, en el que el número de LSP de ser humano administrado es desde aproximadamente 1 millón de células a aproximadamente 2 millones de células.
141. El método del punto 138, en el que el número de LSP de ser humano administrado es mayor o igual al número de células cancerosas administrado.
142. El método del punto 138, en el que el número de LSP de ser humano administrado es desde aproximadamente 5 millones de células a aproximadamente 10 millones de células.
143. El método del punto 128, en el que el sujeto es un ratón inmunodeficiente.
144. El método del punto 128, en el que el número de linfocitos administrado es suficiente para desacelerar la tasa de crecimiento de las células cancerosas cuando se administran con las células cancerosas solas, el compuesto se considera inmunosupresor cuando la tasa de crecimiento de las células cancerosas en presencia del compuesto es mayor que la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos de donantes se administran solos.
145. El método del punto 128, en el que el número de linfocitos administrado no es suficiente para desacelerar la tasa de crecimiento de las células cancerosas cuando se administran con las células cancerosas solas, y el compuesto se considera inmunopotenciador cuando se observa una reducción en la tasa de crecimiento de las células cancerosas, en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos de donantes se administran solos.
146. Un método de evaluación del efecto inmunomodulador de un compuesto, que comprende las etapas de:
administrar un compuesto a evaluar, células cancerosas y menos de aproximadamente 2×10^6 linfocitos a un sujeto; y
controlar la tasa de crecimiento de las células cancerosas,
en el que el compuesto se considera inmunopotenciador cuando se observa una reducción en la tasa de crecimiento de las células cancerosas en comparación con la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos de donantes se administran solos.
147. El método del punto 146, en el que las células cancerosas administradas expresan una molécula inmunosupresora.
148. El método del punto 146, en el que las células cancerosas administradas expresan CD200.
149. El método del punto 146, en el que las células cancerosas administradas regulan de forma positiva la expresión de CD200.
150. Un método de evaluación del efecto inmunomodulador de un compuesto, que comprende las etapas de:
administrar un compuesto a evaluar, células cancerosas y más de aproximadamente 5×10^6 linfocitos a un sujeto; y
controlar la tasa de crecimiento de las células cancerosas,
en el que el compuesto se considera inmunosupresor cuando la tasa de crecimiento de las células cancerosas en presencia del compuesto es mayor que la tasa de crecimiento cuando las células cancerosas y los linfocitos de donantes se administran solos.
151. El método del punto 150, en el que las células cancerosas administradas expresan una molécula inmunosupresora.
152. El método del punto 150, en el que las células cancerosas administradas expresan CD200.

153. El método del punto 150, en el que las células cancerosas administradas regulan de forma positiva la expresión de CD200.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Alexion Pharmaceuticals, Inc.

10 <120> POLIPÉPTIDOS Y ANTICUERPOS OBTENIDOS A PARTIR DE CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA Y USOS DE LOS MISMOS

<130> N1126 EP/1

15 <150> US 11/171.567

<151> 30-06-2005

<150> US 10/996.316

<151> 23-11-2004

20 <150> US 10/894.672

<151> 20-07-2004

<160> 213

25 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

30 <213> conejo

<400> 1

Thr Leu Ser Thr Gly Tyr Ser Val Gly Ser Tyr Val Ile Ala
1 5 10

<210> 2

35 <211> 11

<212> PRT

<213> conejo

<400> 2

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

40 <210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> conejo

45 <400> 3

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 4

<211> 11

50 <212> PRT

<213> conejo

<400> 4

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

55 <210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> conejo

	<400> 5		Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala 1 5 10
	<210> 6		
	<211> 11		
5	<212> PRT		
	<213> conejo		
	<400> 6		Gln Ala Ser Gln Ser Val Asn Asn Leu Leu Ala 1 5 10
10	<210> 7		
	<211> 11		
	<212> PRT		
	<213> conejo		
15	<400> 7		Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Asn Tyr Leu Ala 1 5 10
	<210> 8		
	<211> 11		
	<212> PRT		
20	<213> conejo		
	<400> 8		Leu Ala Ser Glu Asn Val Tyr Ser Ala Val Ala 1 5 10
	<210> 9		
25	<211> 11		
	<212> PRT		
	<213> conejo		
	<400> 9		Leu Ala Ser Glu Asn Val Tyr Gly Ala Val Ala 1 5 10
30	<210> 10		
	<211> 11		
	<212> PRT		
	<213> conejo		
35	<400> 10		Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Leu Leu Ala 1 5 10
	<210> 11		
	<211> 11		
40	<212> PRT		
	<213> conejo		
	<400> 11		Leu Ala Ser Glu Asn Val Ala Ser Thr Val Ser 1 5 10
45	<210> 12		
	<211> 14		
	<212> PRT		
	<213> conejo		

ES 2 569 240 T3

<400> 12

Thr Leu Ser Thr Gly Tyr Ser Val Gly Glu Tyr Pro Val Val
1 5 10

<210> 13
<211> 14
5 <212> PRT
<213> conejo

<400> 13

Thr Leu Arg Thr Gly Tyr Ser Val Gly Glu Tyr Pro Leu Val
1 5 10

10 <210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> conejo

15 <400> 14

Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
20 <213> conejo

<400> 15

Gln Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
25 <213> conejo

<400> 16

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Glu Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

30 <210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> conejo

35 <400> 17

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

<210> 18
<211> 10
40 <212> PRT
<213> conejo

<400> 18

His Ser Glu Glu Ala Lys His Gln Gly Ser
1 5 10

45 <210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> conejo

50 <400> 19

ES 2 569 240 T3

		Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser
		1 5
	<210> 20	
	<211> 7	
	<212> PRT	
5	<213> conejo	
	<400> 20	
		Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
		1 5
	<210> 21	
10	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> conejo	
	<400> 21	
		Leu Ala Phe Thr Leu Ala Ser
		1 5
15	<210> 22	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> conejo	
20	<400> 22	
		Gly Ala Ser Asp Leu Glu Ser
		1 5
	<210> 23	
	<211> 10	
	<212> PRT	
25	<213> conejo	
	<400> 23	
		His Thr Asp Asp Ile Lys His Gln Gly Ser
		1 5 10
	<210> 24	
30	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> conejo	
	<400> 24	
		Leu Ala Ser Lys Leu Ala Ser
		1 5
35	<210> 25	
	<211> 13	
	<212> PRT	
40	<213> conejo	
	<400> 25	
		Ala Thr Ala His Gly Ser Gly Ser Ser Phe His Val Val
		1 5 10
45	<210> 26	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> conejo	

	<400> 26	
		Gln Ser Gly Asp Tyr Ser Ala Gly Leu Thr 1 5 10
5	<210> 27 <211> 10 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 27	
		Gln Ser Gly Tyr Tyr Ser Ala Gly Leu Thr 1 5 10
10	<210> 28 <211> 10 <212> PRT <213> conejo	
15	<400> 28	
		Gln Ser Gly Tyr Tyr Ser Ala Gly Val Thr 1 5 10
20	<210> 29 <211> 14 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 29	
		Gln Gly Gly Asp Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Gly Tyr Gly 1 5 10
25	<210> 30 <211> 10 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 30	
		Gln Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Gly Val Thr 1 5 10
30	<210> 31 <211> 10 <212> PRT <213> conejo	
35	<400> 31	
		Gln Ser Gly Tyr Tyr Ser Gly Gly Ala Thr 1 5 10
40	<210> 32 <211> 9 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 32	
		Gln Gly Tyr Ser Ser Tyr Pro Pro Thr 1 5
45	<210> 33 <211> 8 <212> PRT <213> conejo	

	<400> 33	
		Gln Gly Tyr Ser Ser Tyr Pro Thr 1 5
5	<210> 34 <211> 12 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 34	
10		Ala Gly Tyr Lys Ser Ser Ser Thr Asp Gly Ile Ala 1 5 10
	<210> 35 <211> 11 <212> PRT <213> conejo	
15	<400> 35	
		Gln Ser Gly Tyr Tyr Ser Ala Gly His Leu Thr 1 5 10
20	<210> 36 <211> 12 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 36	
		Leu Gly Gly Phe Gly Tyr Ser Thr Thr Gly Leu Thr 1 5 10
25	<210> 37 <211> 13 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 37	
30		Ala Ile Ala His Gly Thr Glu Ser Ser Phe His Val Val 1 5 10
35	<210> 38 <211> 13 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 38	
		Ala Thr Gly His Gly Ser Gly Ser Ser Ala Gly Val Val 1 5 10
40	<210> 39 <211> 12 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 39	
		Leu Gly Gly Tyr Pro Tyr Ser Ser Thr Gly Thr Ala 1 5 10
45	<210> 40 <211> 11 <212> PRT <213> conejo	
50	<400> 40	

ES 2 569 240 T3

		Gln Ser Gly Trp Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Thr 1 5 10
5	<210> 41 <211> 11 <212> PRT <213> conejo <400> 41	
10		Gln Ser Gly Tyr Tyr Arg Ala Gly Asp Leu Thr 1 5 10
	<210> 42 <211> 11 <212> PRT <213> conejo <400> 42	
15		Gln Ser Gly Tyr Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Thr 1 5 10
20	<210> 43 <211> 10 <212> PRT <213> conejo <400> 43	
25		Gln Ser Asn Ala Trp Ser Val Gly Met Thr 1 5 10
30	<210> 44 <211> 10 <212> PRT <213> conejo <400> 44	
35		Ala Ala Gln Tyr Ser Gly Asn Ile Tyr Thr 1 5 10
	<210> 45 <211> 5 <212> PRT <213> conejo <400> 45	
40		Asn Tyr Ala Met Thr 1 5
	<210> 46 <211> 5 <212> PRT <213> conejo <400> 46	
45		Ser Tyr Gly Leu Ser 1 5
50	<210> 47 <211> 5 <212> PRT <213> conejo	

ES 2 569 240 T3

	<400> 47	
		Thr Tyr Gly Val Ser 1 5
5	<210> 48 <211> 5 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 48	
		Ser Asn Ala Met Gly 1 5
10	<210> 49 <211> 5 <212> PRT <213> conejo	
15	<400> 49	
		Thr Asn Ala Met Gly 1 5
20	<210> 50 <211> 6 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 50	
		Ser Ser Asp Trp Ile Cys 1 5
25	<210> 51 <211> 5 <212> PRT <213> conejo	
30	<400> 51	
		Ser Asp Val Ile Ser 1 5
35	<210> 52 <211> 5 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 52	
		Thr Tyr Ala Met Gly 1 5
40	<210> 53 <211> 5 <212> PRT <213> conejo	
45	<400> 53	
		Ser Asn Ala Met Thr 1 5
50	<210> 54 <211> 5 <212> PRT <213> conejo	

ES 2 569 240 T3

	<400> 54		Asp Phe Ala Met Ser 1 5
5	<210> 55 <211> 5 <212> PRT <213> conejo		
	<400> 55		Ser Tyr Gly Met Asn 1 5
10	<210> 56 <211> 5 <212> PRT <213> conejo <400> 56		
15			Ser Asn Ala Met Ser 1 5
20	<210> 57 <211> 5 <212> PRT <213> conejo <400> 57		
			Thr Asn Ala Ile Ser 1 5
25	<210> 58 <211> 5 <212> PRT <213> conejo <400> 58		
30			Ser Tyr Tyr Met Ser 1 5
35	<210> 59 <211> 5 <212> PRT <213> conejo <400> 59		
			Ser Tyr Thr Met Ser 1 5
40	<210> 60 <211> 5 <212> PRT <213> conejo <400> 60		
45			Ser Asn Ala Ile Ser 1 5
50	<210> 61 <211> 5 <212> PRT <213> conejo <400> 61		

ES 2 569 240 T3

		Thr Asn Ala Met Ser
		1 5
5	<210> 62 <211> 6 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 62	
		Ser Ser Tyr Trp Ile Cys
		1 5
10	<210> 63 <211> 5 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 63	
		Asn Tyr Gly Val Asn
		1 5
15	<210> 64 <211> 15 <212> PRT <213> conejo	
20	<400> 64	
		Ile Ile Ser Ser Asn Gly Gly Ala Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
		1 5 10 15
25	<210> 65 <211> 16 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 65	
		Tyr Phe Asp Pro Val Phe Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Thr Trp Val Asp
		1 5 10 15
30	<210> 66 <211> 16 <212> PRT <213> conejo	
35	<400> 66	
		Tyr Asn Asp Pro Ile Phe Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val Asn
		1 5 10 15
40	<210> 67 <211> 15 <212> PRT <213> conejo	
	<400> 67	
		Ile Ile Ser Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
		1 5 10 15
45	<210> 68 <211> 15 <212> PRT <213> conejo	
50	<400> 68	

1 Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 1 5 10 15
 <210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> conejo
 <400> 69
 Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Ser Ser Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
 1 5 10 15
 Lys
 <210> 70
 10 <211> 16
 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 70
 Tyr Ile Tyr Thr Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Val Asn
 1 5 10 15
 <210> 71
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> conejo
 <400> 71
 Ser Ile Tyr Ala Ser Arg Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 1 5 10 15
 <210> 72
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 72
 Thr Ile Ile Tyr Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 1 5 10 15
 <210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> conejo
 <400> 73
 Val Val Tyr Ala Gly Thr Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
 1 5 10 15
 Lys
 <210> 74
 <211> 16
 <212> PRT
 40 <213> conejo
 <400> 74
 Tyr Ile Asp Pro Asp Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn
 1 5 10 15
 <210> 75
 <211> 15
 45

<212> PRT
<213> conejo

<400> 75

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

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> conejo

10

<400> 76

Tyr Ser Ser Tyr Gly Asn Asn Ala His Tyr Thr Asn Trp Ala Lys
1 5 10 15

<210> 77
<211> 15
<212> PRT
<213> conejo

15

<400> 77

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

20

<210> 78
<211> 15
<212> PRT
<213> conejo

25

<400> 78

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
1 5 10 15

30

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> conejo

<400> 79

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
1 5 10 15

35

<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> conejo

40

<400> 80

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

45

<210> 81
<211> 15
<212> PRT
<213> conejo

<400> 81

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

<210> 82
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> conejo
 5
 <400> 82
 Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Asn Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 1 5 10 15
 Lys
 <210> 83
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> conejo
 10
 <400> 83
 Tyr Ile Asp Pro Val Phe Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn
 1 5 10 15
 15
 <210> 84
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> conejo
 20
 <400> 84
 Asp Asp Glu Gly Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Tyr Met Gly Tyr Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu
 <210> 85
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> conejo
 25
 <400> 85
 Asp Arg Ile Tyr Val Ser Ser Val Gly Tyr Ala Phe Asn Leu
 1 5 10
 30
 <210> 86
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> conejo
 <220>
 <221> variante
 35
 <222> 11
 <223> /sustituir="Cys"
 /sustituir="Asp"
 /sustituir="Glu"
 /sustituir="Phe"
 40
 /sustituir="Gly"
 /sustituir="His"
 /sustituir="Ile"
 /sustituir="Lys"
 /sustituir="Leu"
 45
 /sustituir="Met"
 /sustituir="Asn"
 /sustituir="Pro"
 /sustituir="Gln"
 /sustituir="Arg"
 50
 /sustituir="Ser"
 /sustituir="Thr"
 /sustituir="Val"
 /sustituir="Trp"

	/sustituir="Tyr"
	<220>
	<221> variante
5	<222> 12
	<223> /sustituir="Cys"
	/sustituir="Asp"
	/sustituir="Glu"
	/sustituir="Phe"
10	/sustituir="Gly"
	/sustituir="His"
	/sustituir="Ile"
	/sustituir="Lys"
	/sustituir="Leu"
15	/sustituir="Met"
	/sustituir="Asn"
	/sustituir="Pro"
	/sustituir="Gln"
	/sustituir="Arg"
20	/sustituir="Ser"
	/sustituir="Thr"
	/sustituir="Val"
	/sustituir="Trp"
	/sustituir="Tyr"
25	<220>
	<221 > variante
	<222> 13
	<223> /sustituir="Cys"
30	/sustituir="Asp"
	/sustituir="Glu"
	/sustituir="Phe"
	/sustituir="Gly"
	/sustituir="His"
35	/sustituir="Ile"
	/sustituir="Lys"
	/sustituir="Leu"
	/sustituir="Met"
	/sustituir="Asn"
40	/sustituir="Pro"
	/sustituir="Gln"
	/sustituir="Arg"
	/sustituir="Ser"
	/sustituir="Thr"
45	/sustituir="Val"
	/sustituir="Trp"
	/sustituir="Tyr"
50	<220>
	<221> variante
	<222> 14
	<223> /sustituir="Cys"
	/sustituir="Asp"
	/sustituir="Glu"
55	/sustituir="Phe"
	/sustituir="Gly"
	/sustituir="His"
	/sustituir="Ile"
	/sustituir="Lys"
60	/sustituir="Leu"
	/sustituir="Met"
	/sustituir="Asn"
	/sustituir="Pro"
	/sustituir="Gln"
65	/sustituir="Arg"
	/sustituir="Ser"

/sustituir="Thr"
 /sustituir="Val"
 /sustituir="Trp"
 /sustituir="Tyr"
 5
 <400> 86
 Asp Arg Ala Tyr Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Ala Ala Ala Ala
 1 5 10
 <210> 87
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 87
 Asp Trp Ile Ala Ala Gly Lys Ser Tyr Gly Leu Asp Leu
 1 5 10
 15 <210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> conejo
 20 <400> 88
 Arg Tyr Thr Gly Asp Asn Gly Asn Leu
 1 5
 <210> 89
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> conejo
 <400> 89
 Asp Ala Ala Tyr Ala Gly Tyr Gly Trp Ile Phe Asn Leu
 1 5 10
 30 <210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 90
 Gly Asp Ala Gly Ser Ile Pro Tyr Phe Lys Leu
 1 5 10
 35 <210> 91
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> conejo
 40 <400> 91
 Gly Asn Val Phe Ser Asp Leu
 1 5
 <210> 92
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 92
 Gly Leu Thr Tyr Tyr Pro Leu
 1 5
 50 <210> 93
 <211> 12

ES 2 569 240 T3

<212> PRT
 <213> conejo
 <400> 93
 Gly Ala Tyr Ser Gly Tyr Pro Ser Tyr Phe Asn Leu
 1 5 10
 5
 <210> 94
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> conejo
 10
 <400> 94
 Gly Phe Phe Asn Leu
 1 5
 15
 <210> 95
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 95
 Gly Asn Ala Tyr Ser Asp Leu
 1 5
 20
 <210> 96
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> conejo
 25
 <400> 96
 Asp Gln Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Tyr Gly Asp Tyr Gly Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Asp Leu
 20
 30
 <210> 97
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 97
 Asp Gln Pro Ile Ile Asp Ala Ala Tyr Gly Asp Tyr Gly Ile Ala Thr
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Asp Leu
 20
 35
 <210> 98
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 98
 40

	Asp Gln Pro Ile Ile Thr Thr Asp Tyr Gly Gly Tyr Gly Ile Ala Thr
	1 5 10 15
	Gly Thr Arg Leu Asp Leu
	20
5	<210> 99 <211> 19 <212> PRT <213> conejo <400> 99
	Asp Gln Pro Ile Thr Tyr Ala Gly Tyr Gly Tyr Ala Thr Gly Thr Arg
	1 5 10 15
	Leu Asp Leu
10	<210> 100 <211> 7 <212> PRT <213> conejo <400> 100
	Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Leu
	1 5
15	<210> 101 <211> 13 <212> PRT <213> conejo
20	<400> 101
	Ala Tyr Ile Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Phe Phe Asp Leu
	1 5 10
25	<210> 102 <211> 10 <212> PRT <213> conejo <400> 102
	Glu Ala Ser Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
	1 5 10
30	<210> 103 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial
35	<220> <223> cebador <400> 103
40	ggcctctaga cagcctgtgc tgactcagtc gccctc 36
45	<210> 104 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador

ES 2 569 240 T3

<400> 104
 cgagggggca gcctgggct gacctgtgac ggtcagctgg gtc 43
 5 <210> 105
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 105
 15 gaccagctg accgtcacag gtcagcccaa ggctgcccc tcg 43
 <210> 106
 <211> 34
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 106
 tctaattctg agcagcagca gctgatggag tccg 34
 <210> 107
 30 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 107
 gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgacc aggggtgc 47
 40 <210> 108
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <400> 108
 50 gcacctggt caccgtctcc tcagcctcca ccaagggccc atcggtc 47
 <210> 109
 <211> 28
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 60 <400> 109
 ccactgtcag agctccggg tagaagtc 28
 <210> 110
 65 <211> 23
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

5
<400> 110
gtcaccgggtt cggggaagta gtc 23

10
<210> 111
<211> 10
<212> PRT
<213> murino

15
<400> 111
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> murino

20
<220>
<221> variante
<222> 9
<223> /sustituir="Cys"
/sustituir="Asp"
/sustituir="Glu"
/sustituir="Phe"
/sustituir="Gly"
/sustituir="His"
/sustituir="Ile"
/sustituir="Lys"
/sustituir="Leu"
/sustituir="Met"
/sustituir="Asn"
/sustituir="Pro"
/sustituir="Gln"
/sustituir="Arg"
/sustituir="Ser"
/sustituir="Thr"
/sustituir="Val"
/sustituir="Trp"
/sustituir="Tyr"

30
35
40
45
<400> 112
Asp Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ala His
1 5 10

<210> 113
<211> 10
<212> PRT
<213> murino

50
<400> 113
Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His
1 5 10

55
<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> murino
<400> 114

		Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
		1 5 10
5	<210> 115	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> murino	
	<400> 115	
10		Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His
		1 5 10
	<210> 116	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> murino	
	<400> 116	
15		Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr val Met His
		1 5 10
20	<210> 117	
	<211> 17	
	<212> PRT	
	<213> murino	
25	<220>	
	<221> variante	
	<222> 4	
	<223> /sustituir="Cys"	
	/sustituir="Asp"	
	/sustituir="Glu"	
	/sustituir="Phe"	
	/sustituir="Gly"	
30	/sustituir="His"	
	/sustituir="Ne"	
	/sustituir="Lys"	
	/sustituir="Leu"	
	/sustituir="Met"	
35	/sustituir="Asn"	
	/sustituir="Pro"	
	/sustituir="Gln"	
	/sustituir="Arg"	
	/sustituir="Ser"	
40	/sustituir="Thr"	
	/sustituir="Val"	
	/sustituir="Trp"	
	/sustituir="Tyr"	
	<400> 117	
		Trp Ile Asp Ala Glu Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
		1 5 10 15
45		Gly
	<210> 118	
	<211> 17	
	<212> PRT	
50	<213> murino	
	<400> 118	

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 119
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

<220>
<221> variante
<222> 6
<223> /sustituir="Cys"
/sustituir="Asp"
/sustituir="Glu"
/sustituir="Phe"
/sustituir="Gly"
/sustituir="His"
/sustituir="Ile"
/sustituir="Lys"
/sustituir="Leu"
/sustituir="Met"
/sustituir="Asn"
/sustituir="Pro"
/sustituir="Gln"
/sustituir="Arg"
/sustituir="Ser"
/sustituir="Thr"
/sustituir="Val"
/sustituir="Trp"
/sustituir="Tyr"

<400> 119

Trp Ile Asp Pro Glu Ala Asp Asp Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 120
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

<400> 120

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

<400> 121

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

ES 2 569 240 T3

5

<210> 122
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

<400> 122

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Arg
1 5 10 15

Asp

10

<210> 123
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

<400> 123

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Asn Asn Glu Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

15

<210> 124
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

20

<400> 124

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

25

<210> 125
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

<400> 125

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 126
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

35

<400> 126

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

40

<210> 127
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

ES 2 569 240 T3

<400> 127
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 128
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> murino
 5
 <400> 128
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 129
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> murino
 10
 <400> 129
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 130
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> murino
 20
 <400> 130
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Arg
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 131
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> murino
 25
 <400> 131
 Lys Asn Tyr Tyr Val Ser Asn Tyr Asn Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 30
 <210> 132
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> murino
 35
 <400> 132
 Lys Asn Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Asn Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 40
 <210> 133
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> murino

ES 2 569 240 T3

<400> 133

Lys Asn Tyr Tyr Val Ser Asn Tyr Asn Phe Phe Asp Val
1 5 10

<210> 134
<211> 12
5 <212> PRT
<213> murino

<400> 134

Lys Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

10 <210> 135
<211> 10
<212> PRT
<213> murino

15 <400> 135

Gly Phe Asn Ile Lys Asp His Tyr Met His
1 5 10

<210> 136
<211> 10
20 <212> PRT
<213> murino

<400> 136

Ala Phe Asn Ile Lys Asp His Tyr Met His
1 5 10

25 <210> 137
<211> 10
<212> PRT
30 <213> murino

<400> 137

Gly Phe Asn Leu Lys Asp Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 138
<211> 10
35 <212> PRT
<213> murino

<400> 138

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp Leu His
1 5 10

40 <210> 139
<211> 10
<212> PRT
<213> murino

45 <400> 139

Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala Trp Met Asp
1 5 10

<210> 140
<211> 10

ES 2 569 240 T3

	<212> PRT <213> murino	
	<400> 140	
5		Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His 1 5 10
	<210> 141 <211> 10 <212> PRT <213> murino	
10	<400> 141	
		Gly Phe Thr Phe Ser Gly Phe Ala Met Ser 1 5 10
	<210> 142 <211> 10 <212> PRT <213> murino	
15	<400> 142	
		Gly Phe Thr Phe Thr Gly Tyr Ala Met Ser 1 5 10
20	<210> 143 <211> 10 <212> PRT <213> murino	
25	<400> 143	
		Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Ala Met Ser 1 5 10
	<210> 144 <211> 10 <212> PRT <213> murino	
30	<400> 144	
		Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe Thr Met His 1 5 10
35	<210> 145 <211> 10 <212> PRT <213> murino	
	<400> 145	
		Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Phe Tyr Ile His 1 5 10
40	<210> 146 <211> 10 <212> PRT <213> murino	
45	<400> 146	
		Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Tyr Ile His 1 5 10

ES 2 569 240 T3

5	<210> 147 <211> 10 <212> PRT <213> murino <400> 147	Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp Met His 1 5 10
10	<210> 148 <211> 10 <212> PRT <213> murino <400> 148	Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn Trp Ile His 1 5 10
15	<210> 149 <211> 10 <212> PRT <213> murino	
20	<400> 149	Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Ile Ile Leu 1 5 10
25	<210> 150 <211> 10 <212> PRT <213> murino <400> 150	Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser Tyr Ile His 1 5 10
30	<210> 151 <211> 10 <212> PRT <213> murino	
35	<220> <221> variante <222> 6 <223> /sustituir="Cys"	
40	/sustituir="Asp" /sustituir="Glu" /sustituir="Phe"	
45	/sustituir="Gly" /sustituir="His" /sustituir="Ile" /sustituir="Lys" /sustituir="Leu"	
50	/sustituir="Met" /sustituir="Asn" /sustituir="Pro" /sustituir="Gln" /sustituir="Arg"	
55	/sustituir="Ser" /sustituir="Thr" /sustituir="Val" /sustituir="Trp" /sustituir="Tyr"	

	<400>	151		Gly Phe Asn Ile Lys Xaa Ser Tyr Ile His
			1 5 10	
	<210>	152		
	<211>	10		
5	<212>	PRT		
	<213>	murino		
	<400>	152		
			Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Ile His	
			1 5 10	
	<210>	153		
	<211>	10		
	<212>	PRT		
	<213>	murino		
10	<400>	153		
			Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Met His	
			1 5 10	
	<210>	154		
	<211>	16		
	<212>	PRT		
20	<213>	murino		
	<400>	154		
			Trp Ile Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly	
			1 5 10 15	
	<210>	155		
	<211>	16		
	<212>	PRT		
	<213>	murino		
	<400>	155		
			Trp Ile Pro Glu Ser Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly	
			1 5 10 15	
	<210>	156		
	<211>	16		
	<212>	PRT		
	<213>	murino		
35	<400>	156		
			Trp Ile Pro Glu Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly	
			1 5 10 15	
	<210>	157		
	<211>	16		
	<212>	PRT		
	<213>	murino		
	<220>			
	<221 >	variante		
45	<222>	16		
	<223>	/sustituir="Cys"		
		/sustituir="Asp"		
		/sustituir="Glu"		
		/sustituir="Phe"		
50		/sustituir="Gly"		
		/sustituir="His"		
		/sustituir="Ile"		
		/sustituir="Lys"		

/sustituir="Leu"
 /sustituir="Met"
 /sustituir="Asn"
 /sustituir="Pro"
 /sustituir="Gln"
 /sustituir="Arg"
 /sustituir="Ser"
 /sustituir="Thr"
 /sustituir="Val"
 /sustituir="Trp"
 /sustituir="Tyr"

<400> 157
 Trp Ile Pro Glu Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Ala
 1 5 10 15

<210> 158
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> murino

<400> 158
 Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly
 <210> 159
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> murino

<400> 159
 Trp Ile Asp Pro Glu Ser Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly
 <210> 160
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> murino

<400> 160
 Thr Ile Asp Thr Ser Thr Gly Tyr Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 161
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> murino

<400> 161
 Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly
 <210> 162
 <211> 17

ES 2 569 240 T3

<212> PRT
<213> murino

<400> 162

Gly Val Asn Pro Asn Asn Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 163
<211> 16
<212> PRT
<213> murino

<400> 163

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

<210> 164
<211> 16
<212> PRT
<213> murino

<400> 164

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

<210> 165
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

<400> 165

Trp Ile Asp Pro Glu Ile Gly Ala Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 166
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

<400> 166

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

Arg

<210> 167
<211> 18
<212> PRT
<213> murino

<400> 167

Gly Ile Asn Pro Glu Asn Asn Gly Gly Tyr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 168
<211> 18

<212> PRT
<213> murino

<400> 168

Gly Ile Asn Pro Glu Asn Thr Gly Gly Tyr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

5

<210> 169
<211> 18
<212> PRT
<213> murino

10

<220>
<221> variante
<222> 8
<223> /sustituir="Cys"

15

/sustituir="Asp"
/sustituir="Glu"
/sustituir="Phe"
/sustituir="Gly"

20

/sustituir="His"
/sustituir="Ile"
/sustituir="Lys"
/sustituir="Leu"

25

/sustituir="Met"
/sustituir="Asn"
/sustituir="Pro"
/sustituir="Gln"

30

/sustituir="Arg"
/sustituir="Ser"
/sustituir="Thr"
/sustituir="Val"

35

/sustituir="Trp"
/sustituir="Tyr"

<220>
<221> variante

40

<222> 10
<223> /sustituir="Cys"
/sustituir="Asp"
/sustituir="Glu"

45

/sustituir="Phe"
/sustituir="Gly"
/sustituir="His"
/sustituir="Ile"

50

/sustituir="Lys"
/sustituir="Leu"
/sustituir="Met"
/sustituir="Asn"

55

/sustituir="Pro"
/sustituir="Gln"
/sustituir="Arg"
/sustituir="Ser"

/sustituir="Thr"
/sustituir="Val"
/sustituir="Trp"
/sustituir="Tyr"

<400> 169

Gly Ile Asn Pro Glu Asn Thr Ala Gly Ala Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 170
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

5

<400> 170

Ala Ile Asp Thr Phe Asp Ser Asn Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 171
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

10

<400> 171

Ala Ile Asp Thr Phe Asp Ser Asn Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 172
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

20

<400> 172

Ala Ile Asp Thr Phe Asp Ser Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 173
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

25

<400> 173

Thr Ile Asp Ala Ser Asp Arg Tyr Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 174
<211> 17
<212> PRT
<213> murino

30

<400> 174

His Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
1 5 10 15

35

Gly

<210> 175
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> murino
 5
 <400> 175
 Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Gly Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 10
 <210> 176
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> murino
 <400> 176
 Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Asp
 15
 <210> 177
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> murino
 20
 <400> 177
 Gly Ile Asn Pro Asn Thr Gly Ala Tyr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 25
 <210> 178
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> murino
 <400> 178
 Phe Asn Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5
 30
 <210> 179
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> murino
 <400> 179
 Phe Asn Gly Tyr Leu Ala Leu Asp Tyr
 1 5
 35
 <210> 180
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> murino
 40
 <220>
 <221> variante
 <222> 9
 <223> /sustituir="Cys"
 /sustituir="Asp"
 45
 /sustituir="Glu"
 /sustituir="Phe"

5	/sustituir="Gly" /sustituir="His" /sustituir="Ile" /sustituir="Lys" /sustituir="Leu" /sustituir="Met" /sustituir="Asn" /sustituir="Pro" /sustituir="Gln"	
10	/sustituir="Arg" /sustituir="Ser" /sustituir="Thr" /sustituir="Val" /sustituir="Trp"	
15	/sustituir="Tyr"	
	<400> 180	
		Phe Asn Gly Tyr Gln Ala Leu Asp Ala 1 5
20	<210> 181 <211> 9 <212> PRT <213> murino	
	<400> 181	
25		Phe Asn Gly Tyr Gln Ala Leu Asp Gln 1 5
30	<210> 182 <211> 9 <212> PRT <213> murino	
	<400> 182	
		Phe Asn Gly Tyr Leu Ala Leu Asp Gln 1 5
35	<210> 183 <211> 9 <212> PRT <213> murino	
	<400> 183	
40		Arg Asn Glu Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr 1 5
45	<210> 184 <211> 9 <212> PRT <213> murino <400> 184	
		Arg Asn Glu Tyr Tyr Ile Met Asp Tyr 1 5
50	<210> 185 <211> 10 <212> PRT <213> murino	
	<400> 185	
		Gly Gly Asp Asn Tyr Val Trp Phe Ala Tyr 1 5 10
	<210> 186 <211> 11	

ES 2 569 240 T3

<212> PRT
 <213> murino

 <400> 186

 5 Asn Gly Tyr Asp Asp Gly Val Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 187
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> murino
 10

 <400> 187

 Arg Ser Asn Tyr Arg Tyr Asp Asp Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 188
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> murino
 15

 <400> 188

 Gly Asn Tyr Tyr Ser Gly Thr Ser Tyr Asp Tyr
 1 5 10

 20
 <210> 189
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> murino

 25
 <400> 189

 Leu Tyr Gly Asn Tyr Asp Arg Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 190
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> murino
 30

 <400> 190

 Arg Gly Asp Tyr Tyr Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 35
 <210> 191
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> murino

 40
 <400> 191

 Met Ile Thr Thr Gly Tyr His Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 192
 <211> 12
 <212> PRT
 45
 <213> murino
 <400> 192

 Lys Ala Arg Gly Asp Ser Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

 50
 <210> 193
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> murino

 <400> 193

ES 2 569 240 T3

		Gly Val Asp Tyr
		1
5	<210> 194 <211> 10 <212> PRT <213> murino	
	<400> 194	
		Leu Glu Gly Ser Gly Tyr Gly Phe Ala Tyr
		1 5 10
10	<210> 195 <211> 8 <212> PRT <213> murino	
	<400> 195	
		Ser Lys Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
15	<210> 196 <211> 11 <212> PRT <213> murino	
	<400> 196	
		Cys Asn Phe Tyr Gly Asn Pro Tyr Phe Asp Tyr
		1 5 10
20	<210> 197 <211> 11 <212> PRT <213> murino	
	<400> 197	
		Cys Asn Phe Tyr Ala Asn Pro Tyr Phe Asp Tyr
25	<210> 198 <211> 12 <212> PRT <213> murino	
	<400> 198	
		Arg Pro Met Ile Thr Ala Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
30	<210> 199 <211> 13 <212> PRT <213> murino	
	<400> 199	
		Ile Thr Thr Val Val Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
35	<210> 200 <211> 120 <212> PRT <213> murino	
	<400> 200	
40		
45		
50		

ES 2 569 240 T3

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

<210> 201
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> murino

5

<400> 201

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

<210> 202
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> murino

10

15

ES 2 569 240 T3

<400> 202

```

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

```

<210> 203

<211> 118

<212> PRT

<213> murino

<400> 203

```

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

```

<210> 204

<211> 122

<212> PRT

<213> murino

<400> 204

ES 2 569 240 T3

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser val Thr val Ser Ser
 115 120

<210> 205
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> murino

5

<400> 205

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

10 <210> 206
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> murino

ES 2 569 240 T3

<400> 206

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

<210> 207

<211> 109

<212> PRT

<213> murino

<400> 207

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

<210> 208

<211> 110

<212> PRT

<213> murino

<400> 208

ES 2 569 240 T3

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

<210> 209
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> murino

5

<400> 209

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

<210> 210
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> murino

10

<400> 210

ES 2 569 240 T3

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

<210> 211
<211> 113
<212> PRT
<213> murino

<400> 211

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

Arg

<210> 212
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

ES 2 569 240 T3

<400> 212

gacaagcttg caaggatgga gaggctggtg a 31

5

<210> 213

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> cebador

<400> 213

15

gacggatccg ccccttttc ctctgcttt tctc 34

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti CD200 humanizado aislado, o fragmento de unión a CD200 del mismo, que comprende: una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia indicada en los restos 26-36 de la SEQ ID NO: 209; una CDR2 de
5 cadena ligera que tiene la secuencia indicada en los restos 52-58 de la SEQ ID NO: 209; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia indicada en los restos 91-99 de la SEQ ID NO: 209; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 149; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 174; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 195.
- 10 2. Un anticuerpo anti CD200 humanizado aislado, o fragmento de unión a CD200 del mismo, que comprende: una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia indicada en los restos 26-36 de la SEQ ID NO: 208, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia indicada en los restos 52-58 de la SEQ ID NO: 208, una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia indicada en los restos 91-99 de la SEQ ID NO: 208, una CDR1 de cadena pesada que
15 tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 114, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 165, y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 189.
- 20 3. Un anticuerpo anti CD200 humanizado aislado, o fragmento de unión a CD200 del mismo, que comprende: una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia indicada en los restos 26-35 de la SEQ ID NO: 207; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia indicada en los restos 51-57 de la SEQ ID NO: 207; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia indicada en los restos 90-98 de la SEQ ID NO : 207; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 111; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 118; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia indicada en los restos 100-112 de la SEQ ID NO: 201.
- 25 4. El anticuerpo aislado, o fragmento de unión a CD200 del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en las que el fragmento de unión a CD200 se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fv, scFv, Fab' o F(ab')₂.
- 30 5. Una composición farmacéutica que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable y el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a CD200, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. El anticuerpo aislado, o fragmento de unión a CD200, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto.
- 35 7. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a CD200 del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el cáncer comprende células cancerosas que sobreexpresan CD200.
8. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a CD200 del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en las que el cáncer es leucemia linfocítica crónica.
- 40 9. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a CD200 del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la leucemia linfocítica crónica es leucemia linfocítica crónica de linfocitos B.
- 45 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento del cáncer.

Selección de célula entera de bibliotecas mediante clasificación celular activada de forma magnética (MACS)

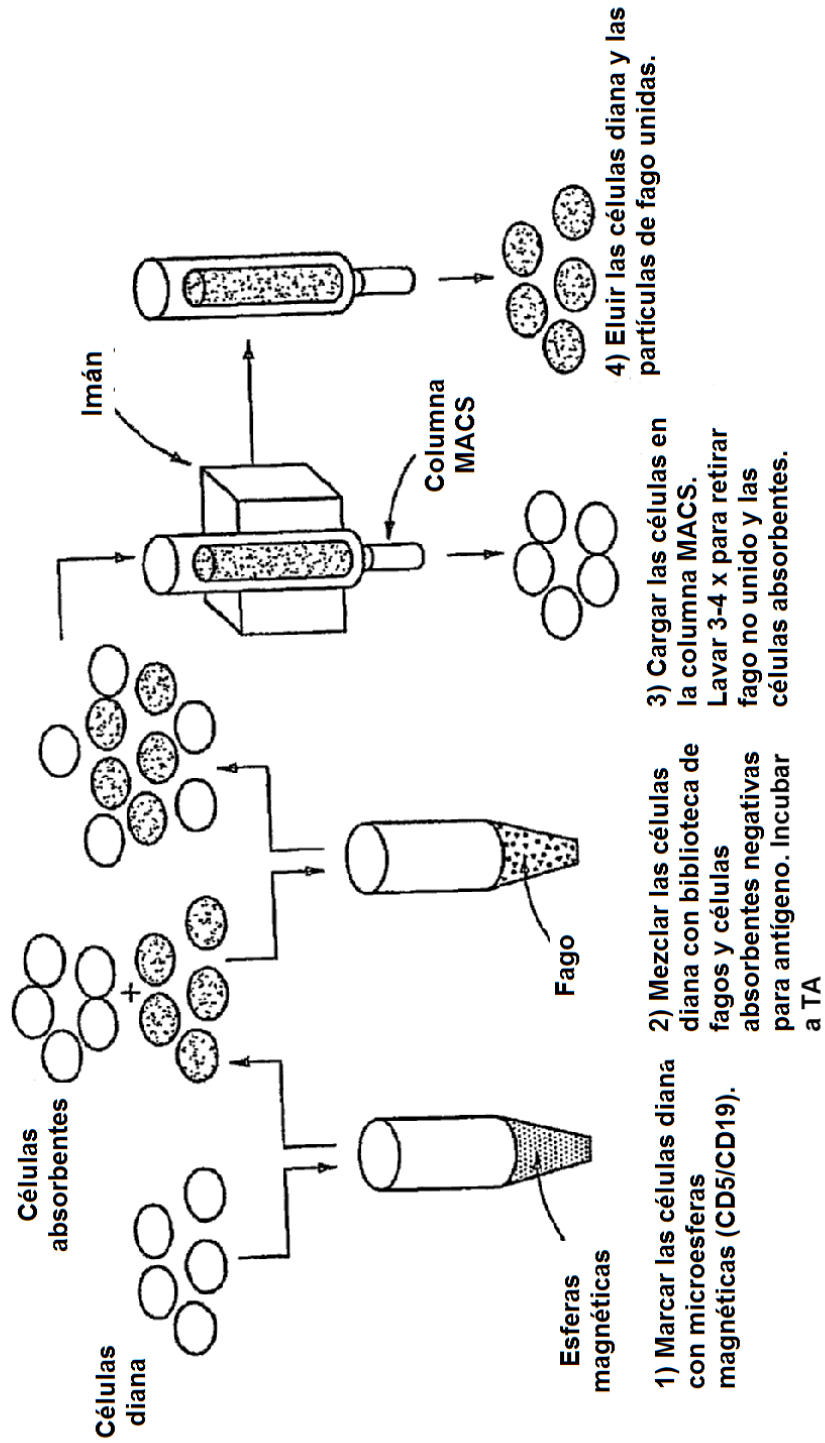
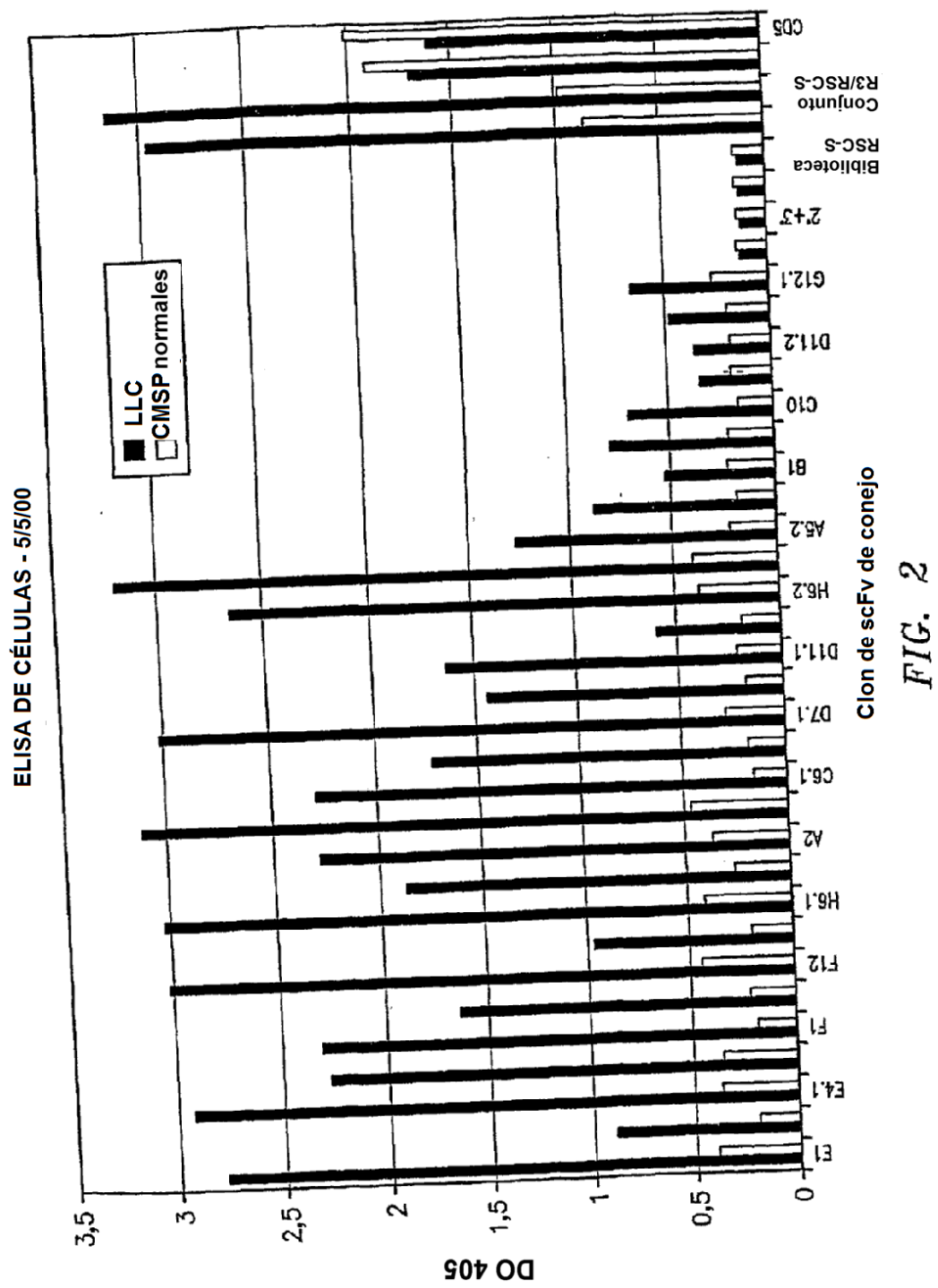
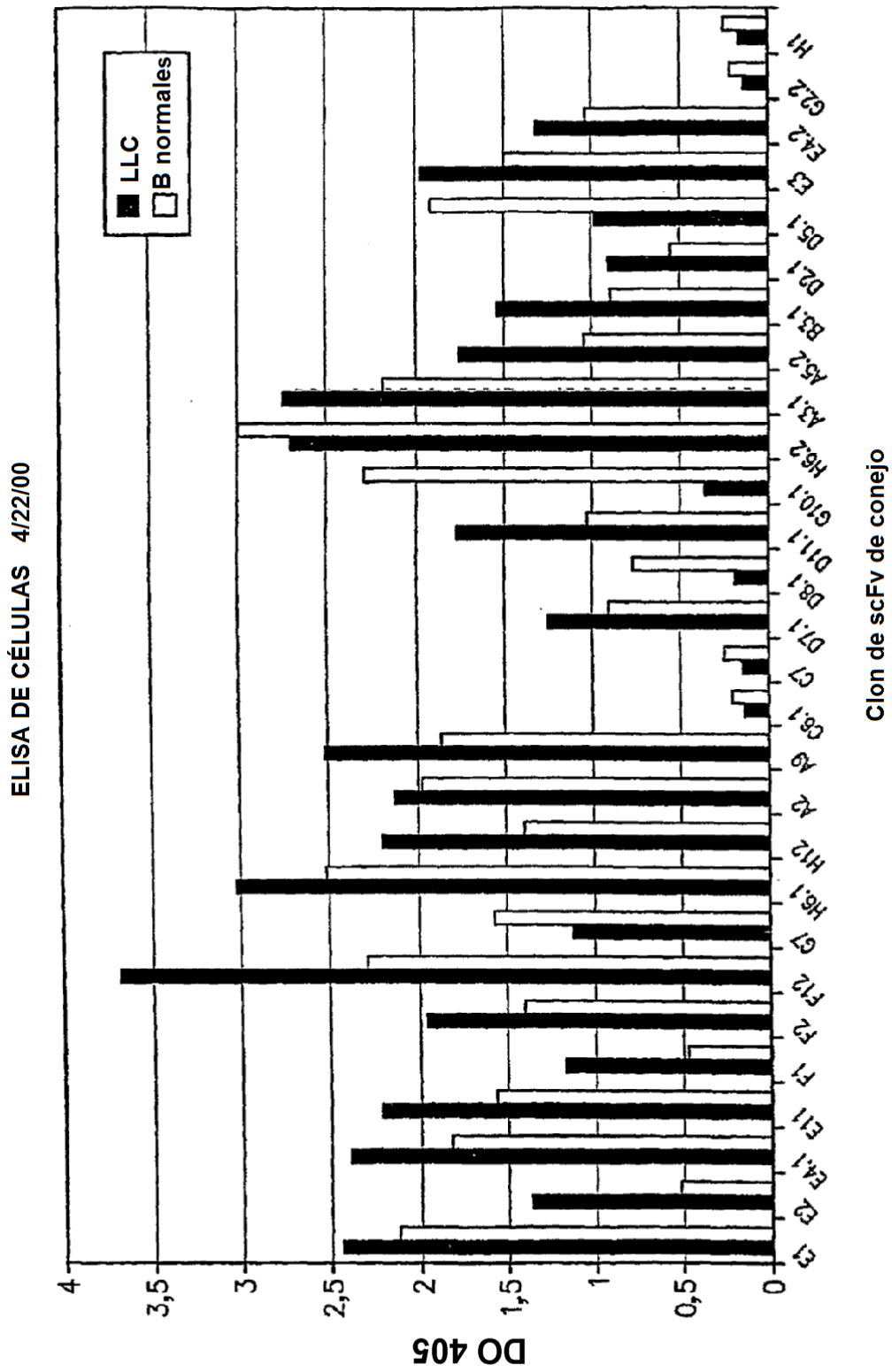
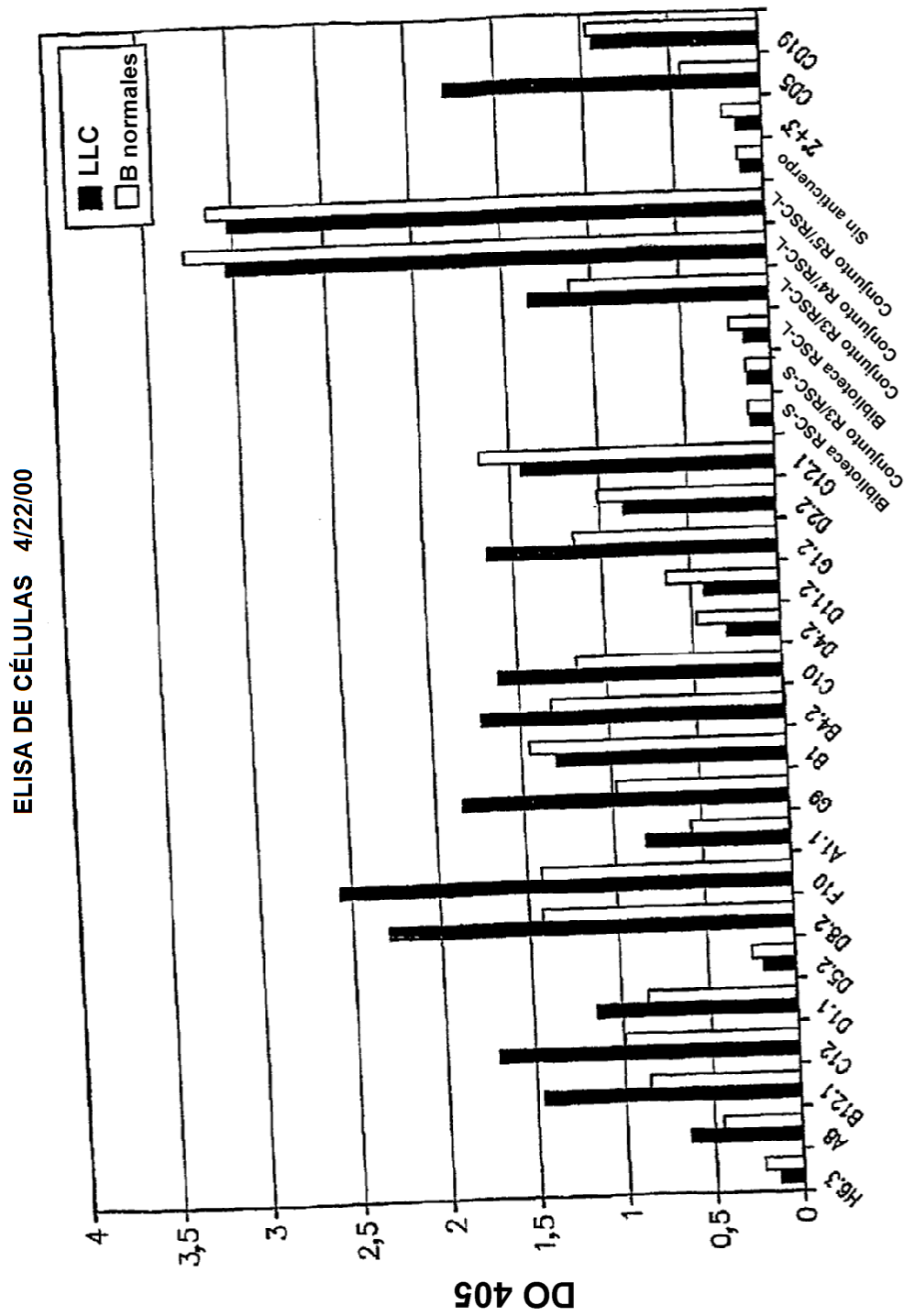


FIG. 1







Clon de scFv de conejo

FIG. 3b

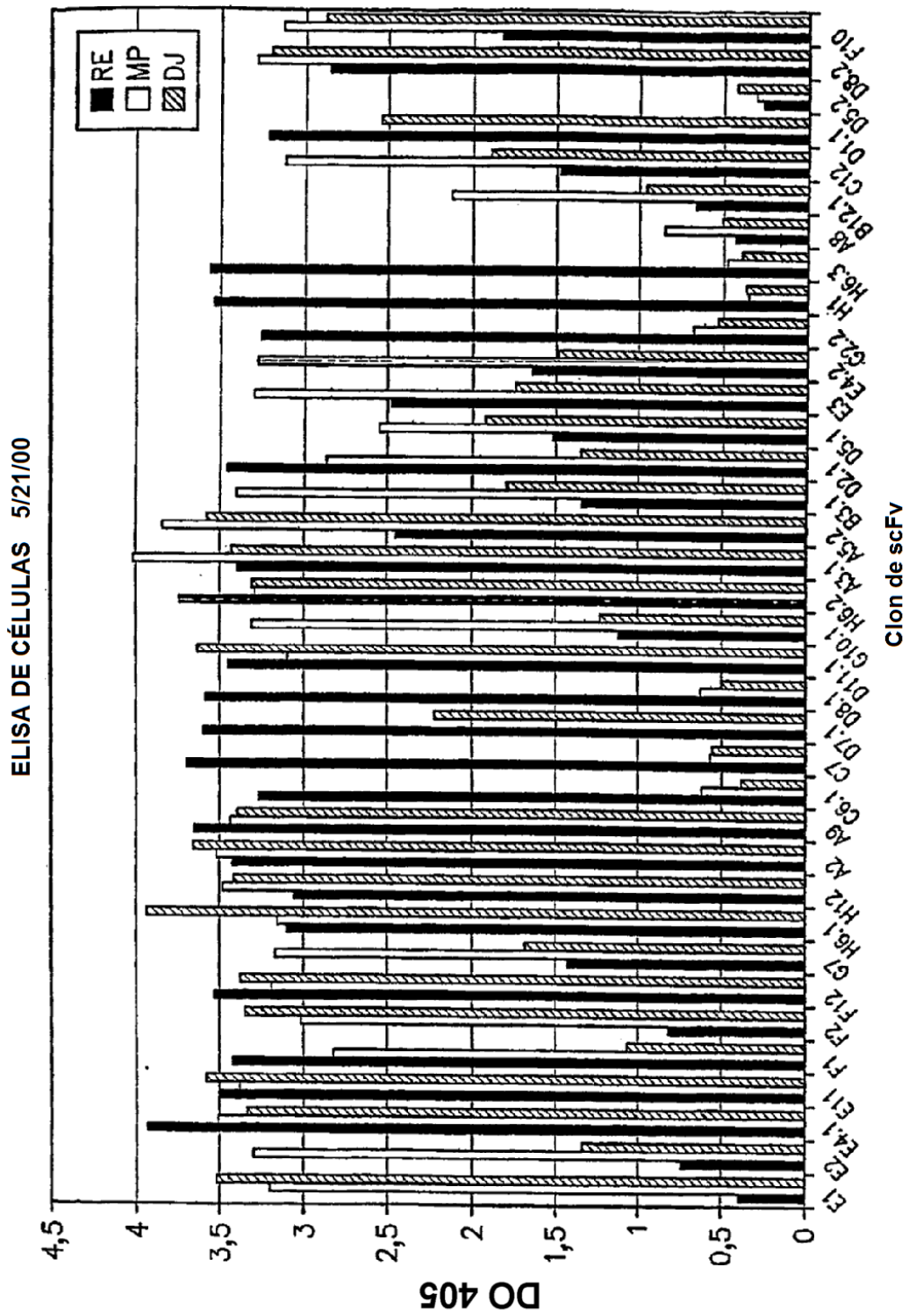


FIG. 4a

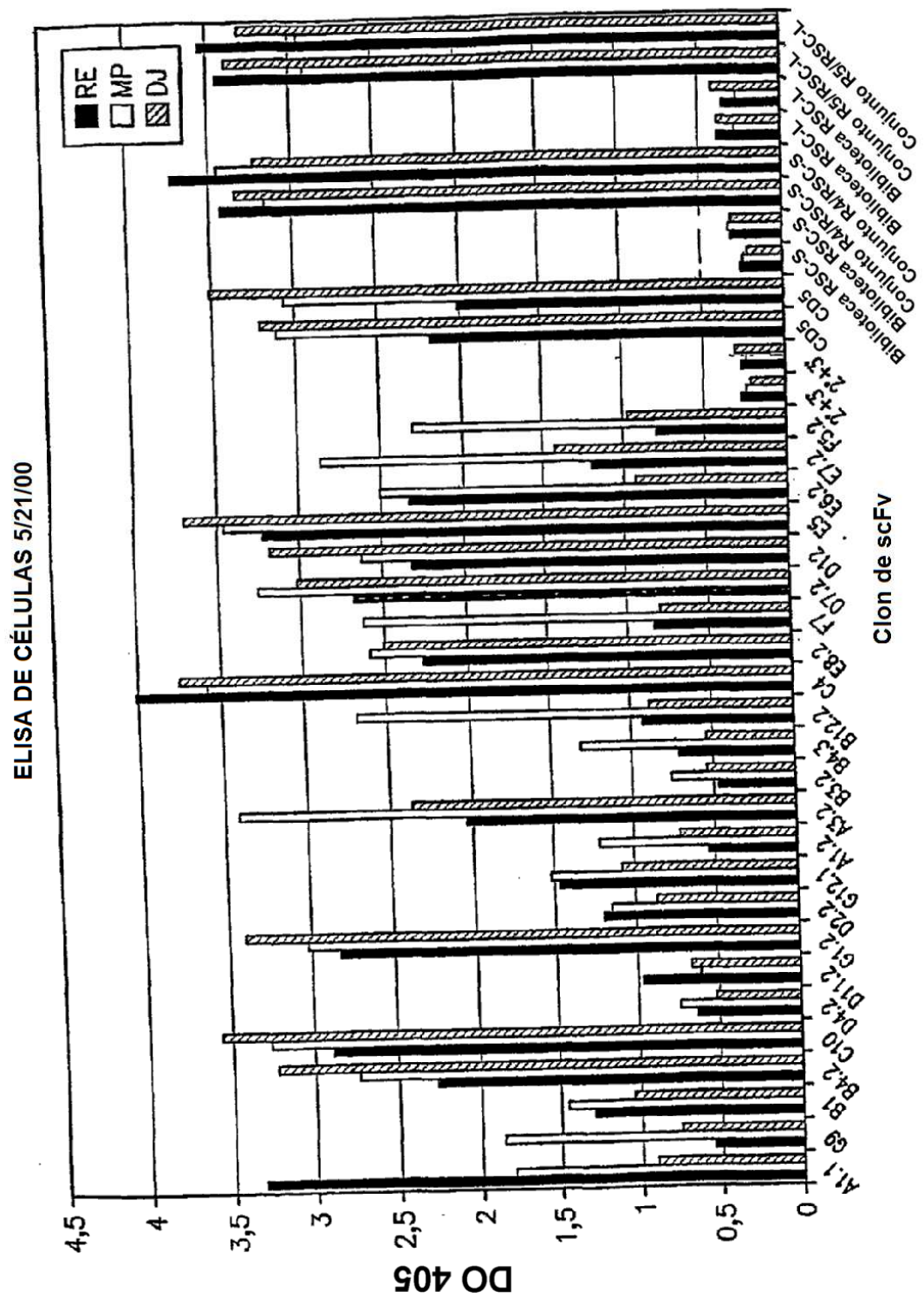
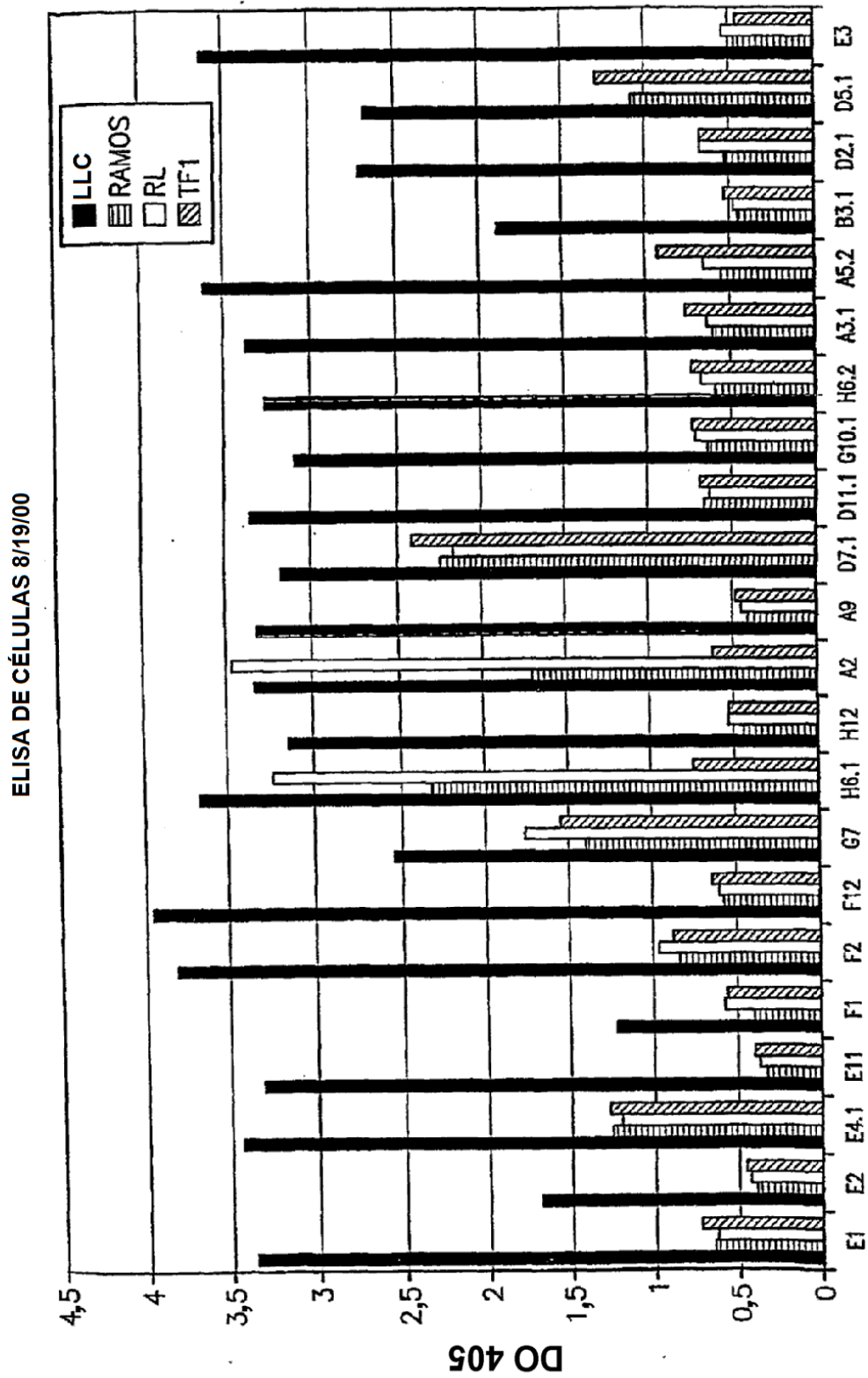


FIG. 4b



Clon de scFV de conejo

FIG. 5a

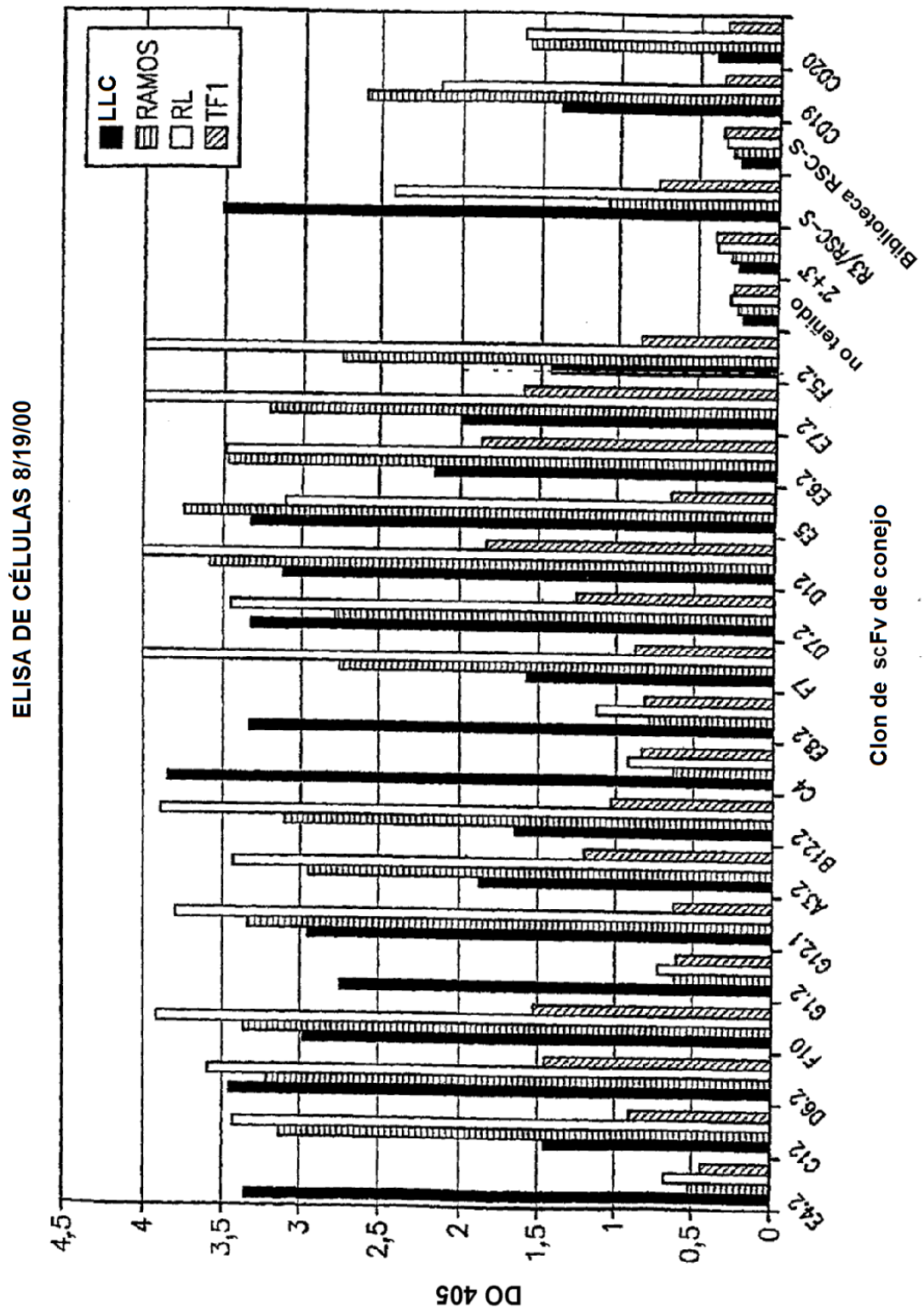


FIG. 5b

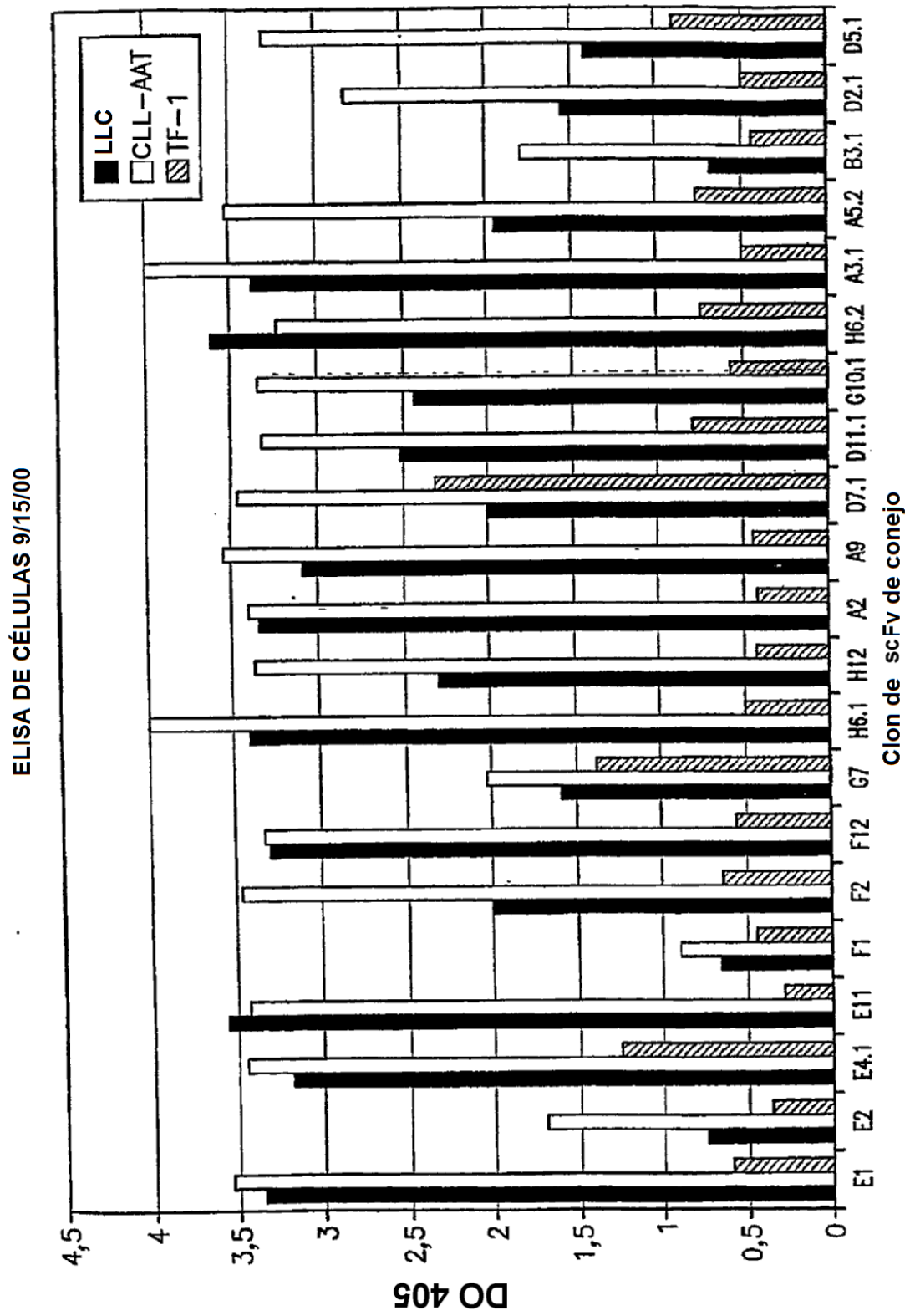


FIG. 6a

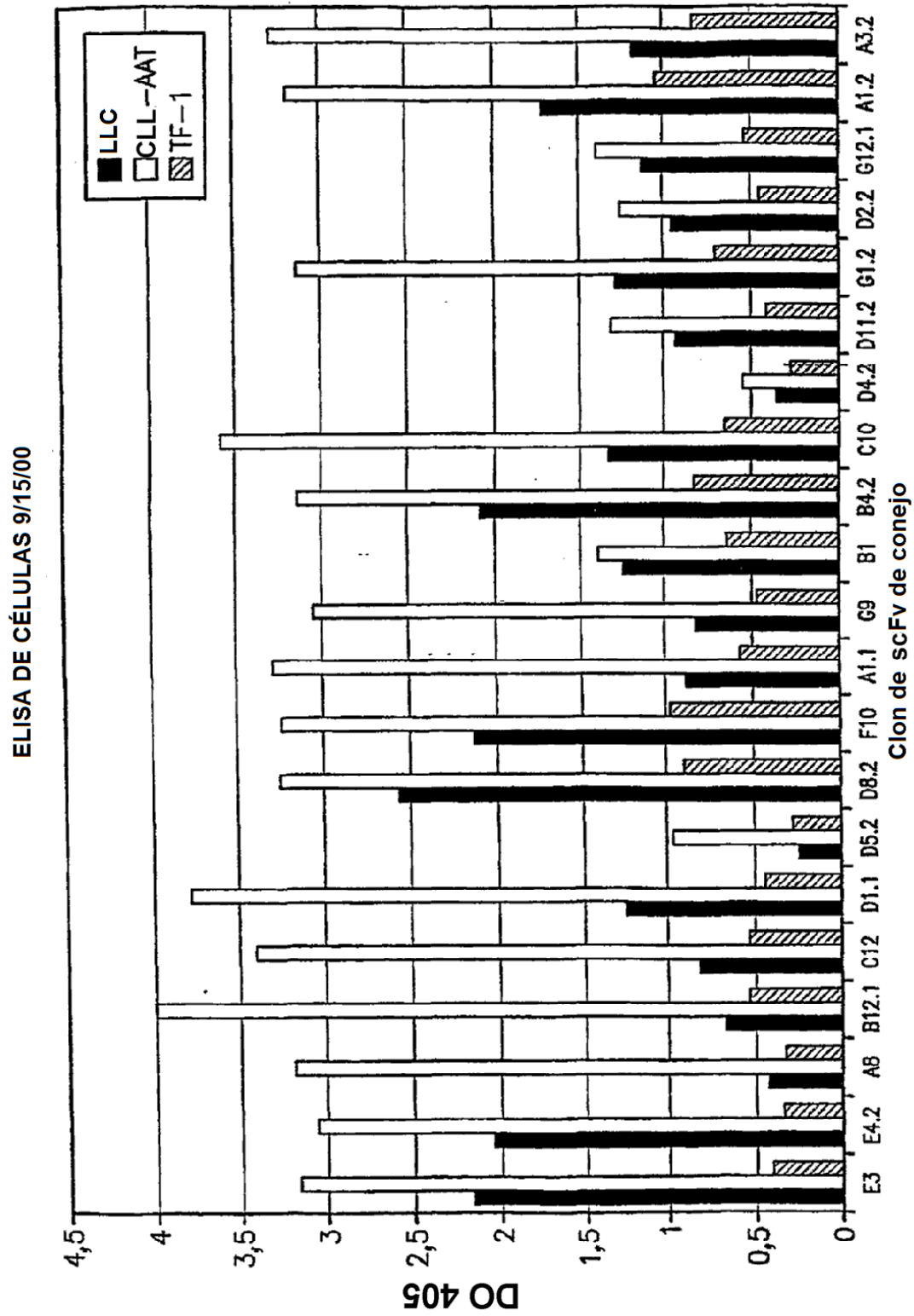


FIG. 6b

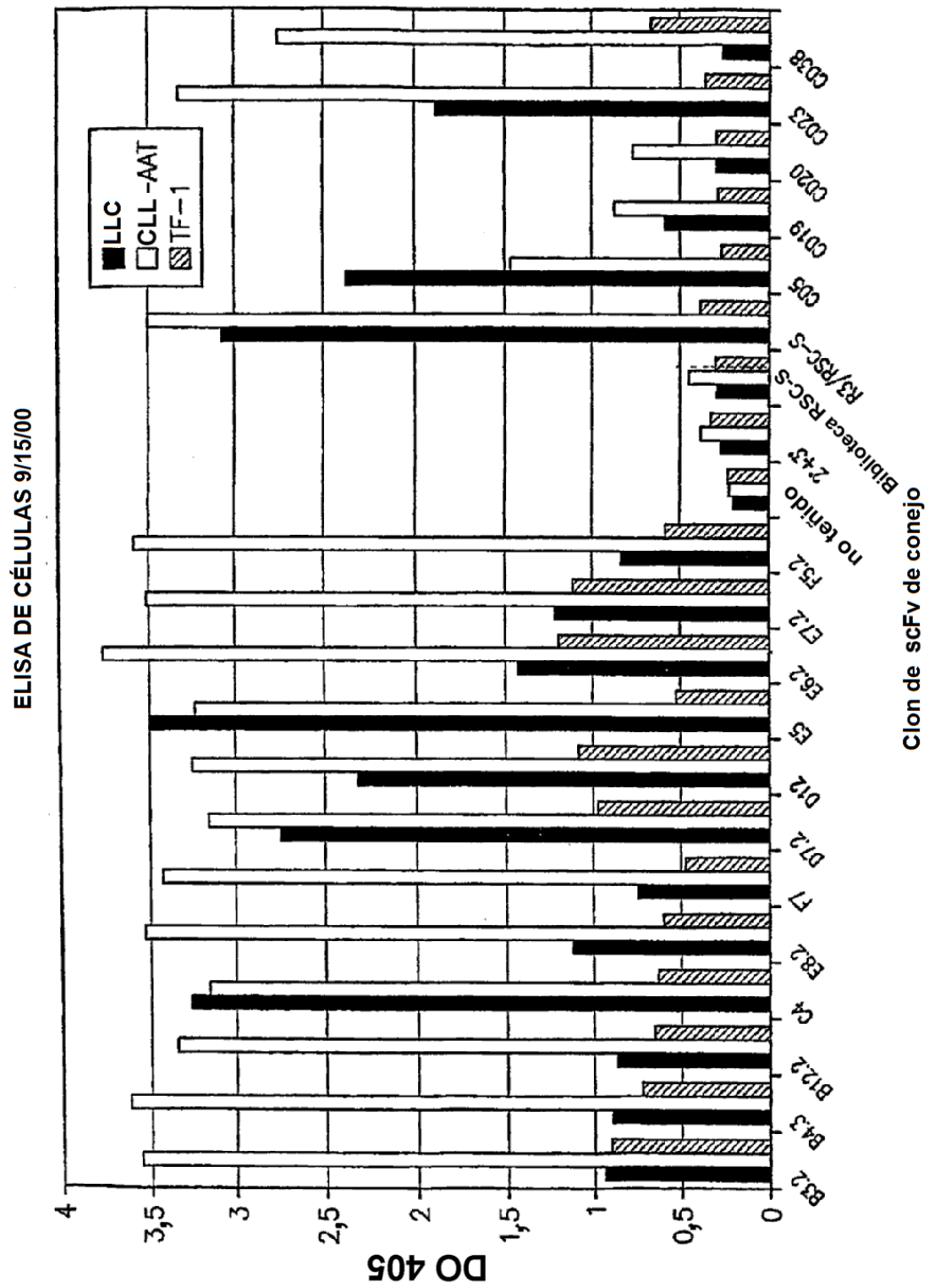
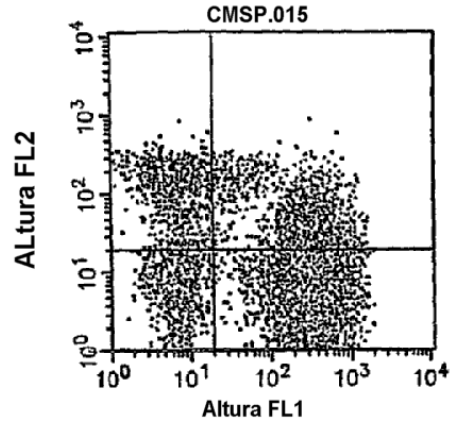
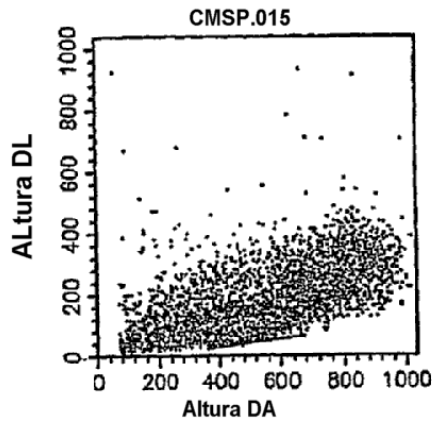


FIG. 6c

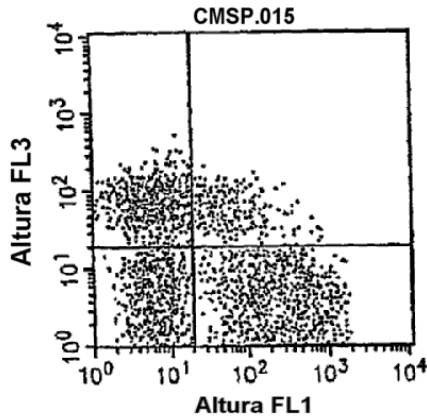
Clon de scFv de conejo

FL2: scFv-9/HA-biotina/SA-PE
FL1: CD5-FITC
FL3: CD19-PerCP



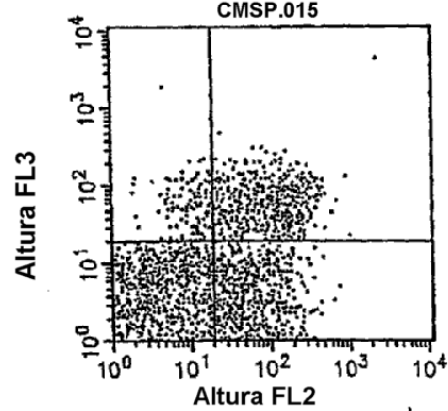
Archivo:CMSP.015
Parámetro X: A FL1 Altura FL 1 (Log)
Parámetro Y: A FL2 Altura FL2 (Log)

Cuad	Sucesos	% Port	% Total	Media geo X	Media geo Y
Arr I	1881	9,40	5,84	6,45	118,74
Arr D	4368	21,84	13,56	266,89	45,49
Ab I	2831	14,16	8,79	6,65	7,40
Ab D	10920	54,60	33,90	282,52	5,72



Archivo:CMSP.015
Parámetro X: A FL1 Altura FL 1 (Log)
Parámetro Y: A FL3 Altura FL 3 (Log)

Cuad	Sucesos	% Port	% Total	Media geo X	Media geo Y
Arr I	1874	9,37	5,82	6,55	65,56
Arr D	409	2,04	1,27	50,57	55,81
Ab I	2838	14,19	8,81	6,57	4,19
Ab D	14879	74,39	46,19	291,30	2,17



Archivo:CMSP.015
Parámetro X: A FL2 Altura FL 2 (Log)
Parámetro Y: A FL3 Altura FL 3 (Log)

Cuad	Sucesos	% Port	% Total	Media geo X	Media geo Y
Arr I	171	0,85	0,53	10,16	54,88
Arr D	2112	10,56	6,56	137,20	64,47
Ab I	13744	68,72	42,67	6,08	2,52
Ab D	3973	19,85	12,33	41,31	2,06

FIG. 7

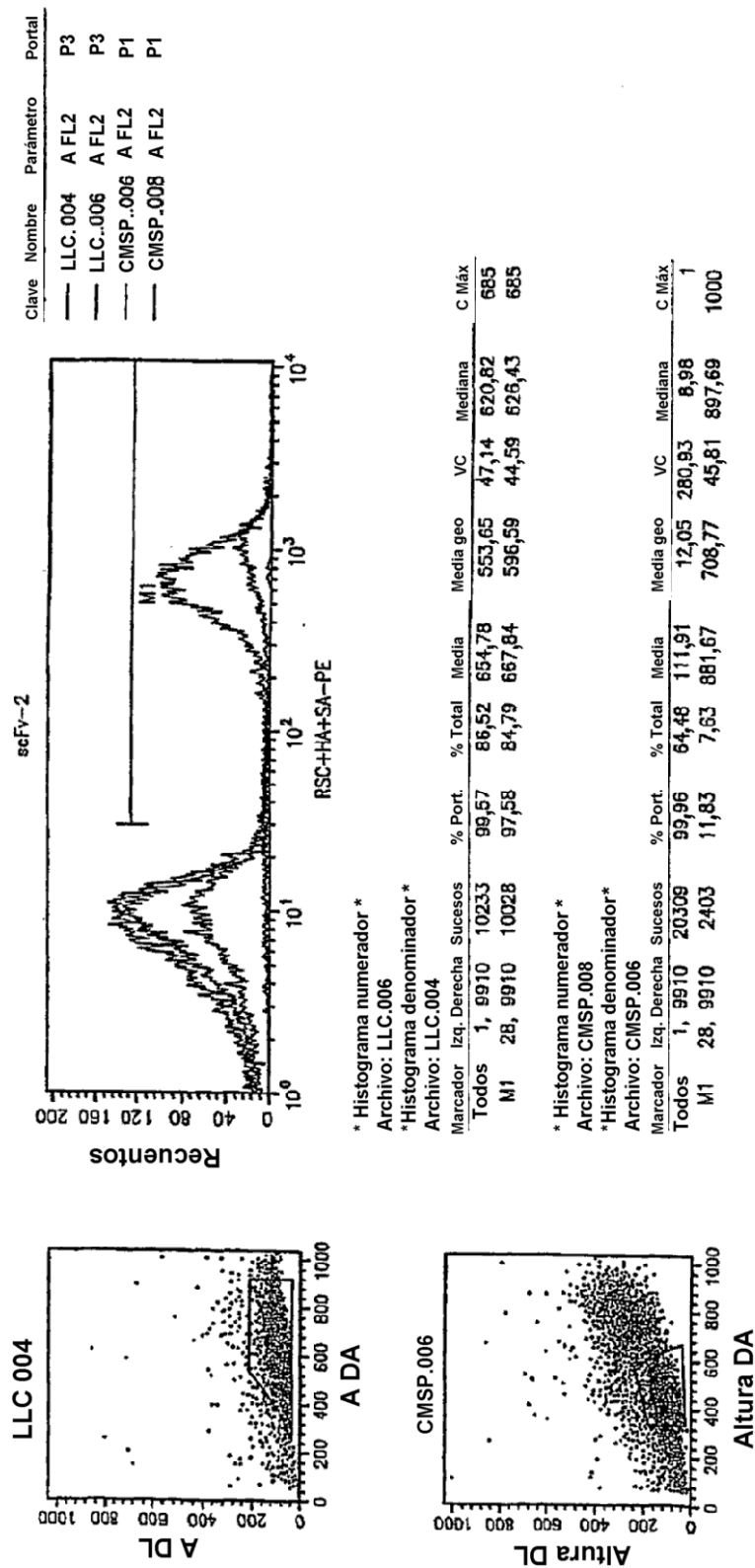


FIG. 8a

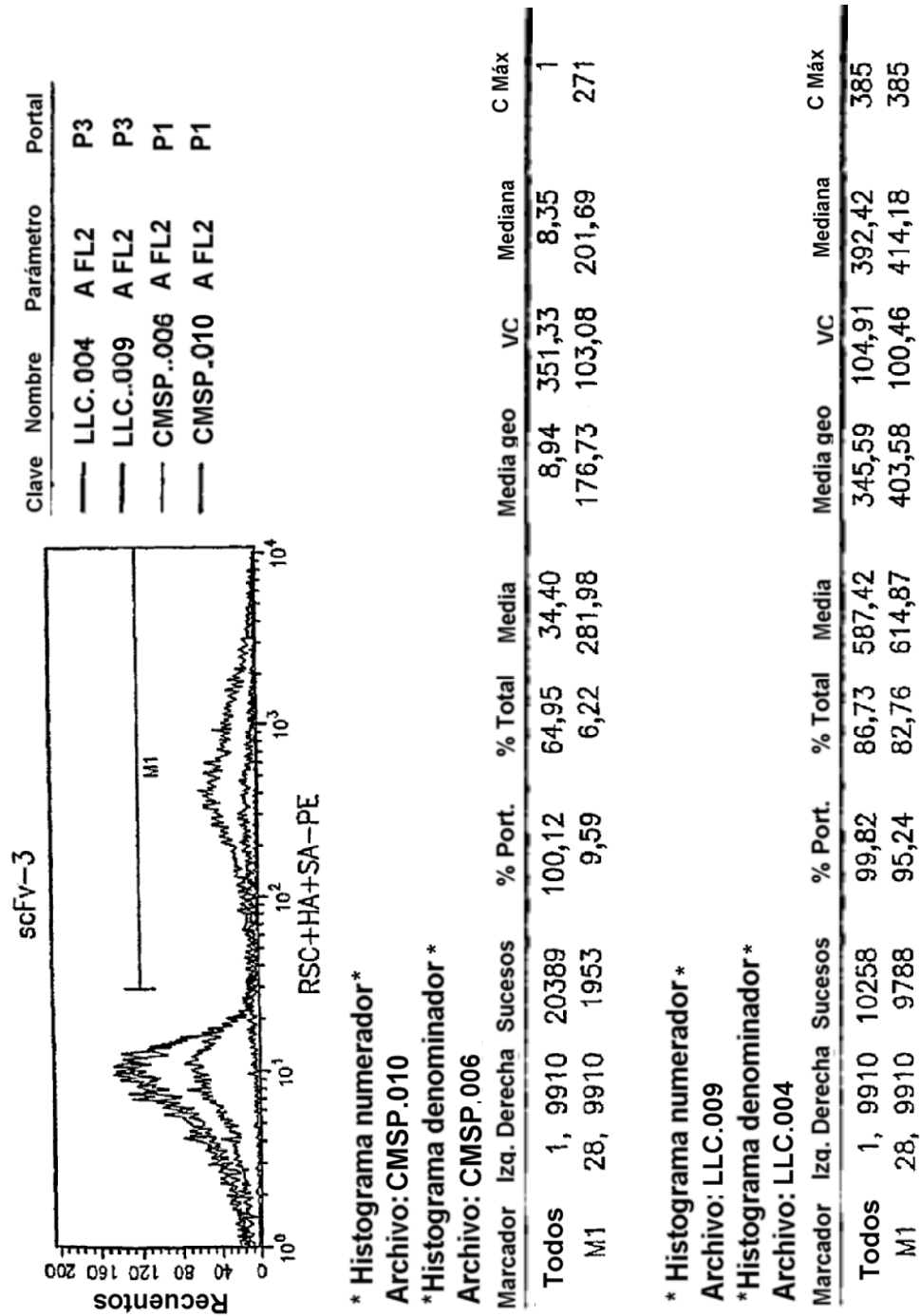


FIG. 8b

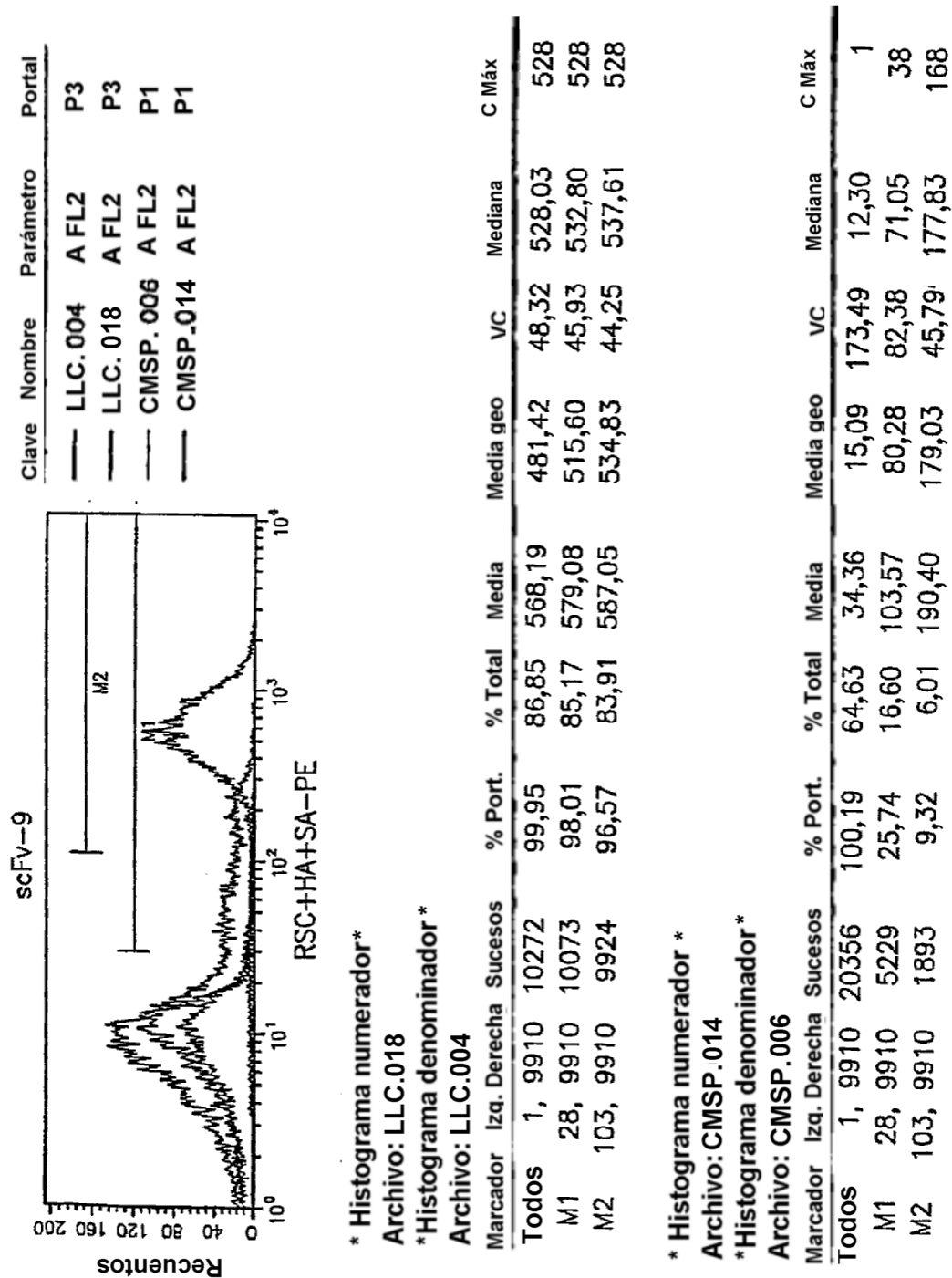


FIG. 8c

Tabla 1. Sumario de clones de scFv de LLC

Conjunto	Clon	LLC	B Primaria	CLL-AAT	RH (LNH)	Ramos (Burkitt)	TF1	Específico de paciente	Pérdida de expresión	Huella de ADN
R3/RSC-S LLC -TF1	E1	++	++	++	.	.	.			1
	E2	++	++	++	.	.	.			2
	E4.1	++	++	++	±	±	±			3
	E11	++	++	++	.	.	.			4
	F1	++	++	++	.	.	.			5
	F2	++	++	++	.	.	.			6
	F12	++	++	++	.	.	.			7
	G7	++	++	++	+	+	+			8
	H6.1	++	++	++	+	+	.			9
	H12	++	++	++	+	+	.			10
	A2	++	±	++	+	+	.			11
	A9	++	++	++	.	.	.			12
	C6.1	.	.	nd	nd	nd	nd	+		13
	C7	.	.	nd	nd	nd	nd	+		14
	D7.1	+	+	+	+	+	+			15
	D8.1	.	+	nd	+	+	+			16
	D11.1	++	++	++	nd	nd	nd	±?		17
	G10.1	+	+	+	.	.	.			18
	H6.2	++	++	++	.	.	.			19
	A3.1	++	++	++	.	.	.			20
	A5.2	++	++	++	.	.	.			21
	B3.1	+	+	+	.	.	.			22
	D2.1	+	+	+	.	.	.			23
	D5.1	+	+	+	±	±	±			24
	E3	+	+	+	.	.	.			25
	E4.2	+	+	+	.	.	.			26
R3/RSC-L LLC -TF1	G2.2	.	.	nd	nd	nd	nd	+		27
	H1	.	.	nd	nd	nd	nd	+		28
	H6.3	.	.	nd	nd	nd	nd	±?		29
	A8	.	+	+	nd	nd	nd	+		30
	B12.1	+	+	++	nd	nd	nd	±?		31
	C12	++	+	++	+	+	+			32
	D1.1	+	+	+	nd	nd	nd			33
	D5.2	.	.	+	nd	nd	nd	±?	+	34
	D8.2	++	+	++	+	+	+			(nd)
	F10	++	+	++	+	+	±			
	A1.1	+	+	++	nd	nd	nd			

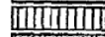
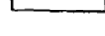
	Células de LLC + linfocitos B primarios
	Células de LLC
	Células de LLC + todos los linfocitos B
	Células de LLC + todos los linfocitos B + TF1 dim
	Células de LLC + todos los linfocitos B + TF1 brillante
	Específicos de pacientes o pérdida de expresión
	No completamente caracterizado

FIG. 9a

Tabla 1. (cont) Sumario de clones de scFv de LLC

Conjunto	Clon	LLC	B Primaria	CLL-AAT	RH (LNH)	Ramos (Burkitt)	TF1	Específico de paciente	Pérdida de expresión	Huella de ADN
R5/RSC-L LLC-B	G9	±?	+	++	nd	nd	nd	±?		(nd)
	B1	+	+	+	nd	nd	nd			35
	B4.2	++	+	++	nd	nd	nd			36
	C10	++	+	++	nd	nd	nd			37
	D4.2	-	-	-	nd	nd	nd	±?	+	38
	D11.2	±?	-	+	nd	nd	nd	±?		39
	G1.2	++	+	++	-	nd	nd			40
	D2.2	+	+	+	nd	nd	nd			41
	G12.1	+	+	+	+	+	+			42
	A1.2	±?	nd	++	nd	+	nd	±?		43
R4/RSC-S LLC-B	A3.2	+	nd	++	+	+	nd			44
	B3.2	-	nd	+	nd	nd	nd	+		45
	B4.3	-	nd	++	nd	nd	nd	+		46
	B12.2	+	nd	++	+	+	+			47
	C4	++	nd	++	-	-	-			48
	E8.2	++	nd	++	-	-	-			49
	F7	+	nd	++	+	+	+			50
	D7.2	++	nd	++	+	+	+			51
	D12	++	nd	++	+	+	+			52
	E5	++	nd	++	+	+	+			53
	E6.2	+	nd	++	+	+	+			54
	E7.2	+	nd	++	+	+	+			
	E5.2	+	nd	++	+	+	+			
LLC-TF1										

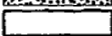
	Células de LLC + linfocitos B primarios
	Células de LLC
	Células de LLC + todos los linfocitos B
	Células de LLC + todos los linfocitos B + TF1 dim
	Células de LLC + todos los linfocitos B + TF1 brillante
	Específicos de pacientes o pérdida de expresión
	No completamente caracterizado

FIG. 9a (Cont.)

Tabla 1. Secuencia de CDR de anticuerpos scFv de conejo específicos de LLC

CLON	CDR1-CL	CDR2-CL	CDR3-CL
A2c	TLSTGYSVGSYVIA (SEQ ID NO: 1)	HSEEAHQGS (SEQ ID NO: 18)	ATAHGSSSFHV (SEQ ID NO: 25)
G12.1c	QASESIRN---YLA (SEQ ID NO: 2)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGDYSA---GLT (SEQ ID NO: 26)
B4.2a	QASESIRN---YLA (SEQ ID NO: 2)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGYISA---GLT (SEQ ID NO: 27)
E1c	QASESISN---WLA (SEQ ID NO: 3)	RASLT---AS (SEQ ID NO: 20)	QSGYISA---GVT (SEQ ID NO: 28)
F2d	QASESISN---YLA (SEQ ID NO: 4)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGYISA---GLT (SEQ ID NO: 27)
E5e	QASQNIYS---NLA (SEQ ID NO: 5)	LAFTL---AS (SEQ ID NO: 21)	QGGYSSSSSYGYG (SEQ ID NO: 29)
H6.2b	QASQSVNN---LLA (SEQ ID NO: 6)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGYSP---GVT (SEQ ID NO: 30)
G10.1	QASESINN---YLA (SEQ ID NO: 7)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGYSG---GAT (SEQ ID NO: 31)
D11.1c	LASENVYS---AVA (SEQ ID NO: 8)	GASDL---ES (SEQ ID NO: 22)	Q-GYSSYPPT (SEQ ID NO: 32)
A5.2c	LASENVYG---AVA (SEQ ID NO: 9)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	Q-GYSSYP-T (SEQ ID NO: 33)
F1d	QASQSVNN---LLA (SEQ ID NO: 6)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	AGYKSSSTD-GIA (SEQ ID NO: 34)
F1e	QASQISN---LLA (SEQ ID NO: 10)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGYISA---GHLT (SEQ ID NO: 35)
E4.2	LASENVAS---TVS (SEQ ID NO: 11)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	LGGFGYSTT-GLT (SEQ ID NO: 36)
E2c	TLSTGYSVGEYPVV (SEQ ID NO: 12)	HTDDIKHQGS (SEQ ID NO: 23)	AIAHGTSSSFHV (SEQ ID NO: 37)
A9c	TLSTGYSVGEYPVV (SEQ ID NO: 12)	HTDDIKHQGS (SEQ ID NO: 23)	AIAHGTSSSFHV (SEQ ID NO: 37)
E11e	TLRTGYSVGEYPLV (SEQ ID NO: 13)	HTDDIKHQGS (SEQ ID NO: 23)	ATCHGSSSAGVV (SEQ ID NO: 38)
A1.1	LASEDIYS---GLS (SEQ ID NO: 14)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	LGGYPYSTT-GTA (SEQ ID NO: 39)
F5.2	QASQSVSN---LLA (SEQ ID NO: 15)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGWYSA---GALT (SEQ ID NO: 40)
F10b	QASQSVNN---LLA (SEQ ID NO: 6)	RASLT---AS (SEQ ID NO: 20)	QSGYISA---GALT (SEQ ID NO: 41)
F7a	QASQSVSN---LLA (SEQ ID NO: 15)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGYISA---GLT (SEQ ID NO: 27)
F6b	QASQSVSN---LLA (SEQ ID NO: 15)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGYISA---GLT (SEQ ID NO: 27)
C12b	QASQSVSN---LLA (SEQ ID NO: 15)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGYISA---GALT (SEQ ID NO: 42)
D2.1b	QASQSVNN---LLA (SEQ ID NO: 6)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSGYISA---GLT (SEQ ID NO: 27)
D1.1	QASEDIES---YLA (SEQ ID NO: 16)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	QSNWSV---GMT (SEQ ID NO: 43)
D2.2a	QSSQSIAGA---YLS (SEQ ID NO: 17)	LASKL---AS (SEQ ID NO: 24)	AAQYSGN---IYT (SEQ ID NO: 44)
D2.2b	LASENVYG---AVA (SEQ ID NO: 9)	GASNL---ES (SEQ ID NO: 19)	Q-GYSSYP-T (SEQ ID NO: 33)

FIG. 9B

CLON	CDR1-CP	CDR2-CP	CDR3-CP
A2c	NYAMT (SEQ ID NO: 45)	LISSNGGA--DYASWAK (SEQ ID NO: 64)	DDEGYDDYGDYMGVFTL (SEQ ID NO: 84)
G12.1c	SYGLS (SEQ ID NO: 46)	YFDPVFGNI--YYATWVD (SEQ ID NO: 65)	DRIYVSSVG---YAFNL (SEQ ID NO: 85)
B4.2a	TYGVS (SEQ ID NO: 47)	YNDIFGNT--YYATWVN (SEQ ID NO: 66)	DRAYASSG---YXXX (SEQ ID NO: 86)
E1c	SNAMG (SEQ ID NO: 48)	LISSSGGT--YYASWAK (SEQ ID NO: 67)	DWIAAGKS---YGLDL (SEQ ID NO: 87)
F2d	TNAMG (SEQ ID NO: 49)	LISSSGST--YYASWAK (SEQ ID NO: 68)	DWIAAGKS---YGLDL (SEQ ID NO: 87)
E5e	SSDWIC (SEQ ID NO: 50)	CIYTGSSSTWYASWAK (SEQ ID NO: 69)	RYTGDNG-----NL (SEQ ID NO: 88)
H6.2b	SDVIS (SEQ ID NO: 51)	YIYTGDSST--DYASWVN (SEQ ID NO: 70)	DAAYAGYGV---IFNL (SEQ ID NO: 89)
G10.1	SDVIS (SEQ ID NO: 51)	YIYTGDSST--DYASWVN (SEQ ID NO: 70)	DAAYAGYGV---IFNL (SEQ ID NO: 89)
D1.1.1c	TYAMG (SEQ ID NO: 52)	SIYASRSP--YYASWAK (SEQ ID NO: 71)	GDAGSIP-----YFKL (SEQ ID NO: 90)
A5.2c	TYAMG (SEQ ID NO: 52)	SIYASRSP--YYASWAK (SEQ ID NO: 71)	GDAGSIP-----YFKL (SEQ ID NO: 90)
F1d	SNAMT (SEQ ID NO: 53)	TIYGDNT--YYASWAK (SEQ ID NO: 72)	GNV-----FSDL (SEQ ID NO: 91)
F1e	DEAMS (SEQ ID NO: 54)	VYAGTRGDTYANWAK (SEQ ID NO: 73)	GLT-----YYPL (SEQ ID NO: 92)
F4.2	DEAMS (SEQ ID NO: 54)	VYAGTRGDTYANWAK (SEQ ID NO: 73)	GLT-----YYPL (SEQ ID NO: 92)
F2c	SYGMN (SEQ ID NO: 55)	YIDPDYGST--YYASWVN (SEQ ID NO: 74)	GAYSGYPS-----YFNL (SEQ ID NO: 93)
A9c	SYGMN (SEQ ID NO: 55)	YIDPDYGST--YYASWVN (SEQ ID NO: 74)	GAYSGYPS-----YFNL (SEQ ID NO: 93)
E11e	SNAMS (SEQ ID NO: 56)	ITVPSGNV--YYASWAK (SEQ ID NO: 75)	G-----FENL (SEQ ID NO: 94)
A1.1	TNAIS (SEQ ID NO: 57)	YSYGNNA--HYTNWAK (SEQ ID NO: 76)	GNA-----YSDL (SEQ ID NO: 95)
F5.2	SNAMS (SEQ ID NO: 56)	LIICSGIT--YYANWAK (SEQ ID NO: 77)	DQPIIYAGYGDYGLATGTRLDL (SEQ ID NO: 96)
F10b	SYTMS (SEQ ID NO: 58)	LISSSGTS--YYATWAK (SEQ ID NO: 78)	DQPIIDAAYGDYGLATGTRLDL (SEQ ID NO: 97)
F7a	SYTMS (SEQ ID NO: 59)	LISSSGSA--YYATWAK (SEQ ID NO: 79)	DQPIITDYGGYGLATGTRLDL (SEQ ID NO: 98)
F6b	SNALS (SEQ ID NO: 60)	LIVSGGTT--YYADWAK (SEQ ID NO: 80)	DQPIYAGYGY---ATGTRLDL (SEQ ID NO: 99)
C12b	SNALS (SEQ ID NO: 60)	LIVSGGTT--YYADWAK (SEQ ID NO: 80)	DQPIYAGYGY---ATGTRLDL (SEQ ID NO: 99)
D2.1b	TNAMS (SEQ ID NO: 61)	TIYGTNA--YYASWAK (SEQ ID NO: 81)	GNT-----YSDL (SEQ ID NO: 100)
D1.1	SNAMS (SEQ ID NO: 56)	TIYGTNA--YYASWAK (SEQ ID NO: 81)	GNT-----YSDL (SEQ ID NO: 100)
D2.2a	SSYWIC (SEQ ID NO: 62)	CIYTGSGSTWYASWAK (SEQ ID NO: 82)	AYIYGGYGY---FFDL (SEQ ID NO: 101)
D2.2b	NYGVN (SEQ ID NO: 63)	YIDPVFGST--YYASWVN (SEQ ID NO: 83)	EASFYI-----GMDL (SEQ ID NO: 102)

CLON: Designación del clon representativo para la secuencia; CL: cadena ligera de Ig; CP: cadena pesada de Ig;

CDR: Región determinante de complementariedad

FIG. 9B (Cont.)

Tabla 1 (cont). Patrón de expresión de anticuerpos scFv de conejo específicos de LLC

CLON	LLC	B	RL	Ramos	TF-1	Ag	Enlazador
A2c	+	+	++	+	-		C
G12.1c	+	+	+	+	-	CD19	L
B4.2a	+	nd	+	+	-		L
E1c	++	+	-	-	-	CD23	C
F2d	++	+	-	-	-		C
E5e	±	nd	-	-	-		C
H6.2b	++	++	-	-	-		C
G10.1	+	+	-	-	-		C
D11.1c	++	+	-	-	-	CD23	C
A5.2c	++	+	-	-	-		C
F1d	+	±	-	-	-		C
F1e	++	nd	-	-	-		C
E4.2	+	+	-	-	-		C
E2c	+	±	-	-	-		C
A9c	++	+	-	-	-		C
E11e	++	+	-	-	-		C
A1.1	+	+	nd	nd	nd		L
F5.2	+	nd	+	+	-		L
F10b	nd	nd	nd	nd	nd		L
F7a	nd	nd	nd	nd	nd		L
F6b	nd	nd	nd	nd	nd		L
C12b	nd	nd	nd	nd	nd		L
D2.1b	nd	nd	nd	nd	nd		C
D1.1	+	+	nd	nd	nd		L
D2.2a	nd	nd	nd	nd	nd		L
D2.2b	nd	nd	nd	nd	nd		C

CLON: Designación de clon representativo para la secuencia

PATRÓN DE EXPRESIÓN: Unión de anticuerpos scFv a células primarias humanas y líneas celulares como se determina mediante ensayo de ELISA de célula completa

LLC: Leucemias linfocíticas crónicas (tumores primarios y línea celular CLL-AAT)

B: Linfocitos B primarios humanos normales

RL: Línea celular de linfoma no-Hodgkin

Ramos: Línea celular de linfoma de Burkitt

TF-1: Línea celular de eritroleucemia humana

Ag: Antígeno reconocido por el anticuerpo scFv (determinado por inmunoprecipitación y espectrometría de masas)

Enlazador: Tipo de secuencia enlazadora entre las regiones VL y VH. C, enlazador corto; L, enlazador largo

FIG. 9C

Tabla 2. Intensidades de fluorescencia medias de células LLC-B y CMSP normales marcadas con anticuerpos scFv

Donante	Anticuerpo y proporción LLC/CMSP					
	scFv-2	proporción	scFv-3	proporción	scFv-6	proporción
LLC (ML)	590	0,83	398	2,2	284	2,1
CMSP-1	715		181		137	
LLC (JR)	311	0,85	207	2,4	nd	nd
CMSP-2	368		87		nd	
LLC (HTS)	219	0,69	173	1,6	nd	nd
CMSP-3	317		106		nd	
LLC (RE)	305	0,59	360	3	nd	nd
CMSP-4	513		121		nd	
LLC (GB)	262	0,47	387	1,8	nd	nd
CMSP-5	563		212		nd	
					117	1,7
					67	
					176	3,6
					49	
					142	1,7
					81	
					163	1,5
					106	

Se analizaron CMSP primarias de cinco pacientes diagnosticados con LLC y cinco donantes normales por citometría de flujo. Se determinaron las medias geométricas de las intensidades de fluorescencia para las células teñidas con cuatro anticuerpos scFv distintos. Para los scFv que se unen a antígenos sobreexpresados en células de LLC, la proporción LLC/CMSP de las intensidades de fluorescencia es $> 1,0$

FIG. 10

Comparación de la expresión del antígeno scFv-9 y de CD38 en células de LLC

ID del paciente	%CD19 ⁺	%CD38 ⁺	%scFv-9 ⁺	ScFv-9 Level	CD38	ScFv-9
ML	80	40	98	266	Alta	Baja
IB	86	87	96	366	Alta	Baja
BH	76	56	86	284	Alta	Alta
JG	82	92	97	125	Alta	Baja
RE	87	97	100	125	Alta	Baja
EM	91	8	95	268	Baja	Alta
HS	76	11	94	268	Baja	Alta
MP	40	6	95	280	Baja	Alta
JR	81	12	92	124	Baja	Baja
GB	65	20	98	187	Baja	Baja

FIG. 11

Identificación de antígenos de scFv

- Biotiniliación de superficie celular (células CCL-ATT)
- Aislamiento de membranas (cavitación por nitrógeno, centrifugación diferencial)
- Inmunoprecipitación con scFv-HA acoplada a esferas anti HA
- SDS-PAGE
- Detección mediante tinción de Coomassie o transferencia de Western AP-estreptavidina
- MALDI-MS o LC-MS/MS para obtener los espectros de masas de los péptidos/secuencias de los péptidos

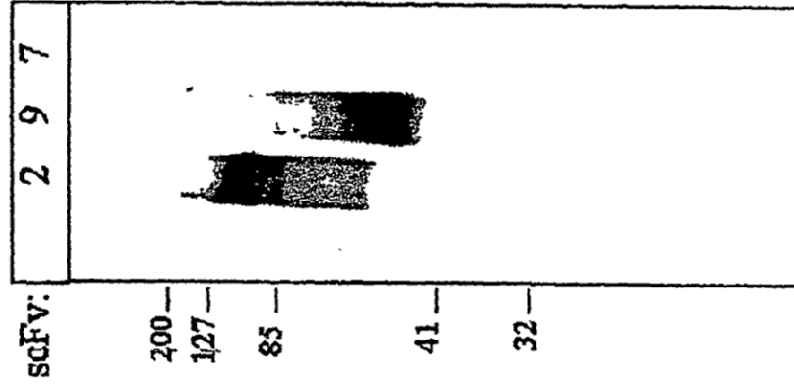


FIG. 12

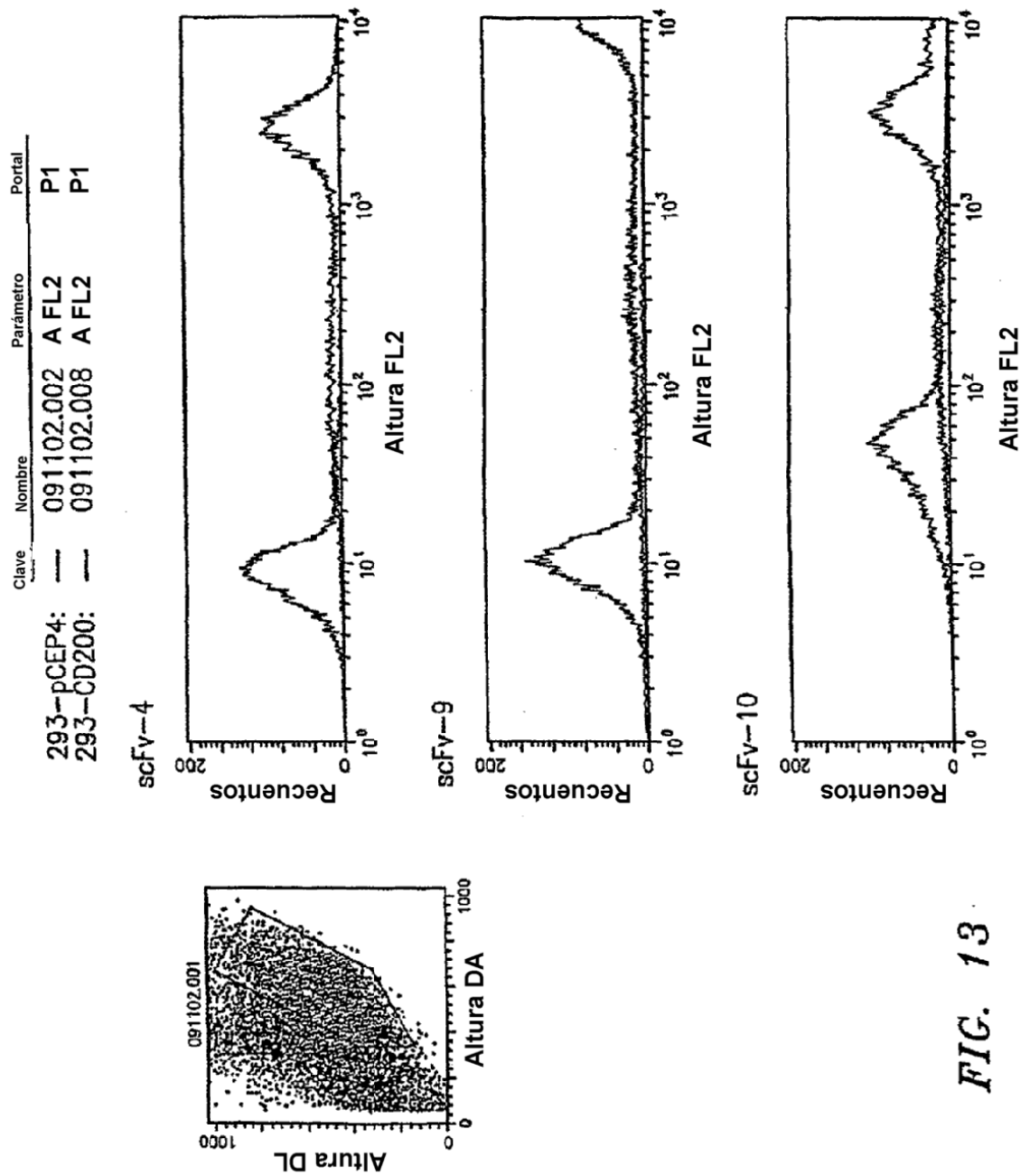


FIG. 13

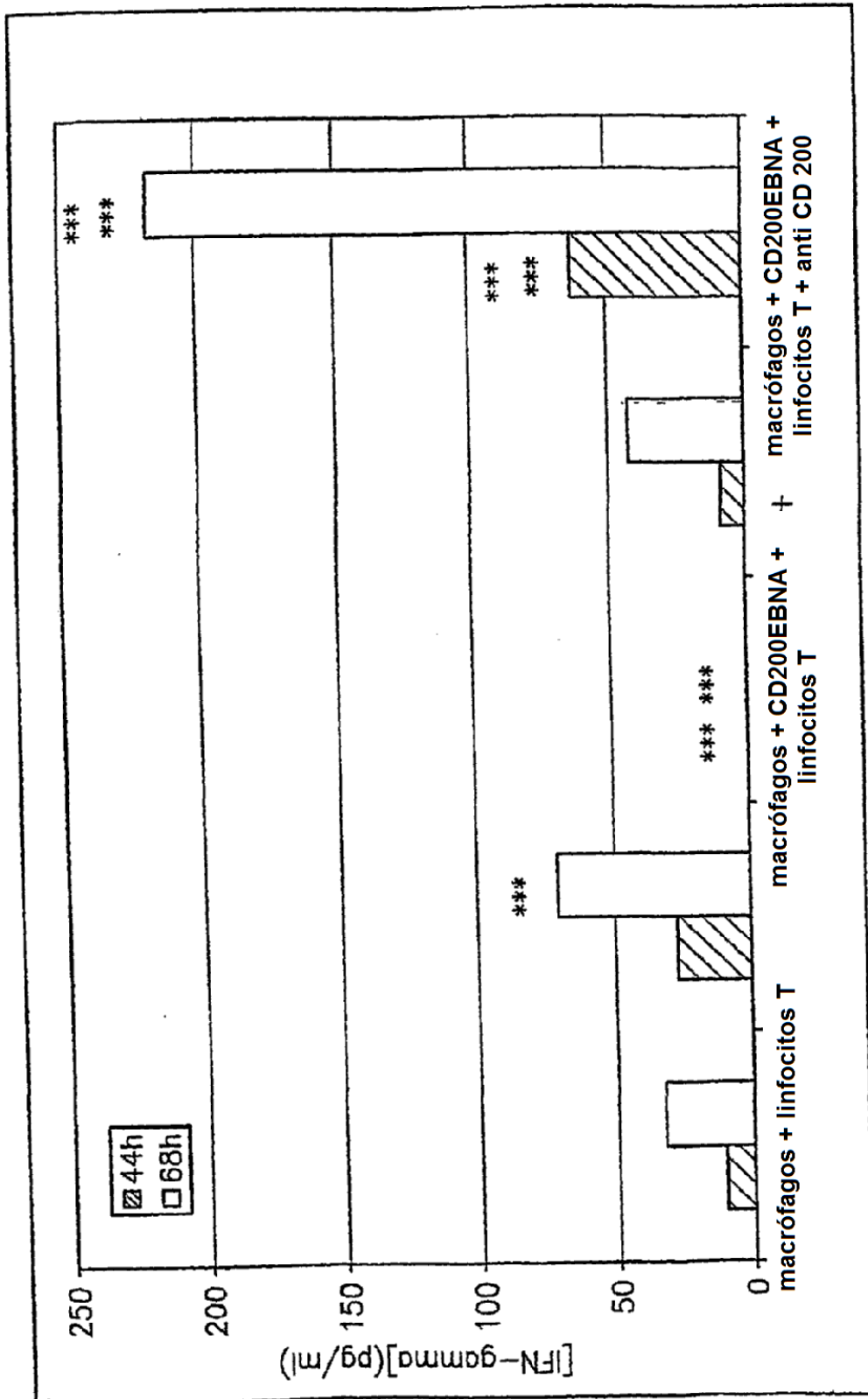


FIG. 14

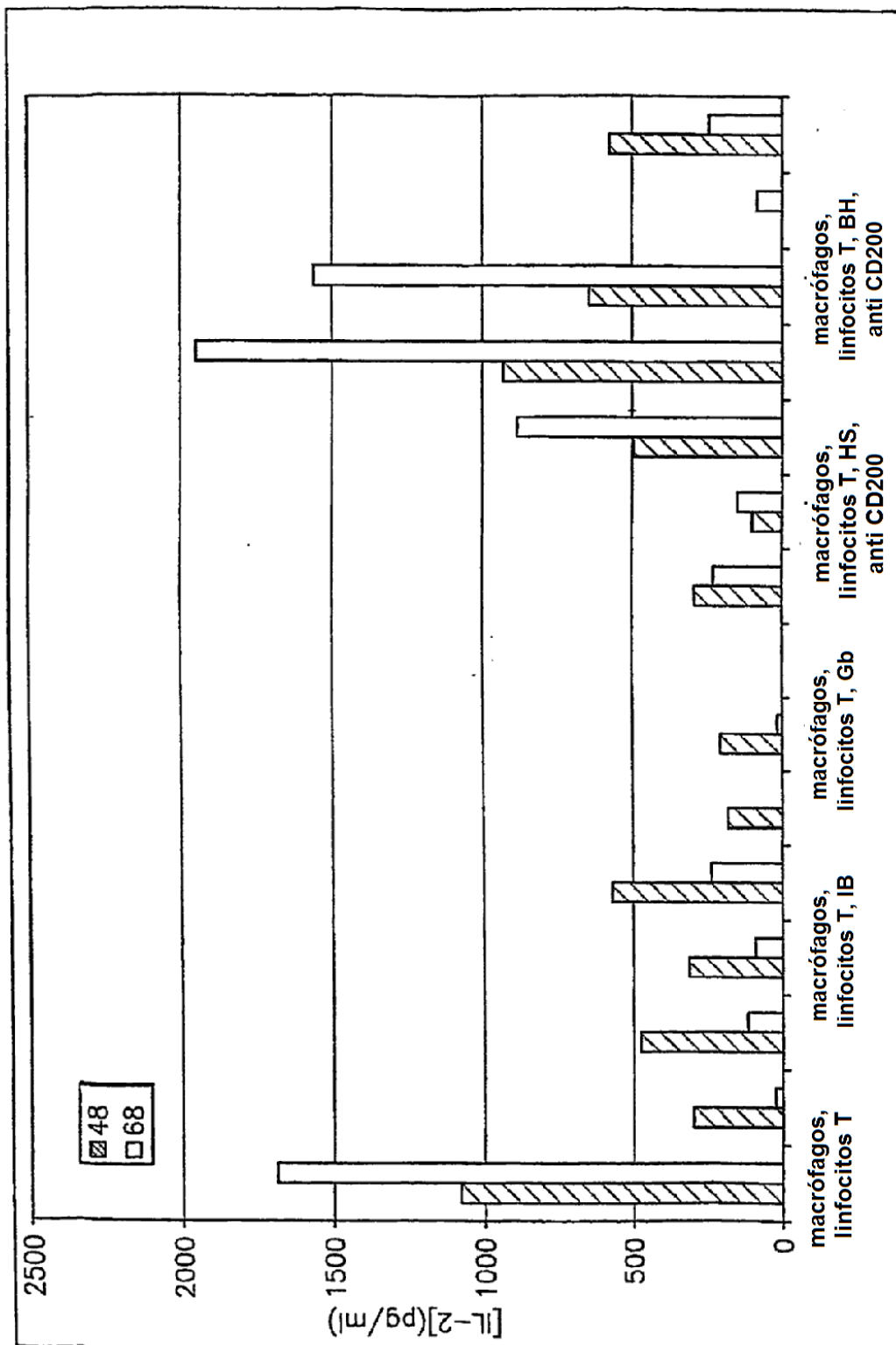
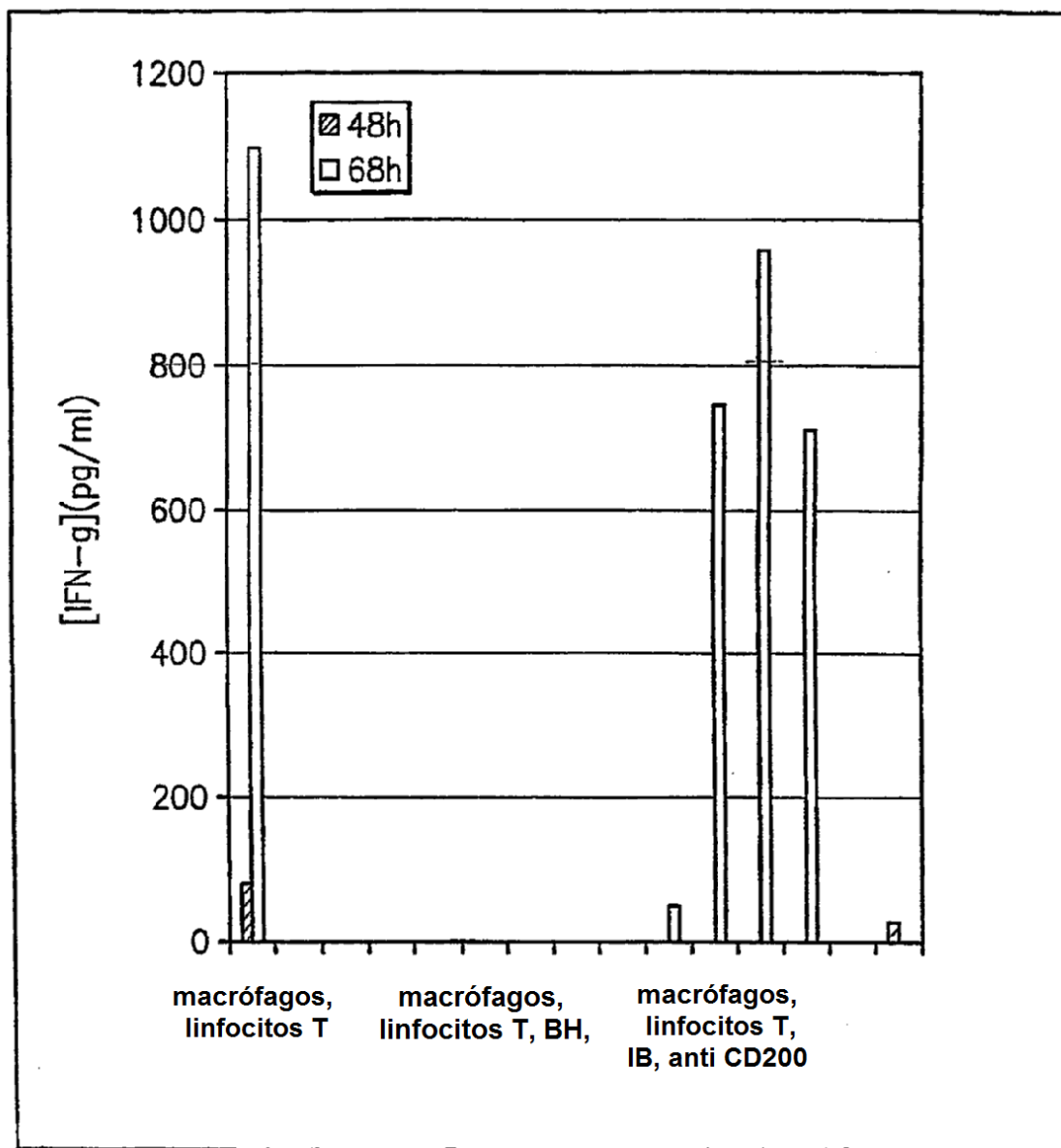


FIG. 15

*FIG. 16*

Grupo 1: 8 ratones, cada uno 4×10^6 células RAJI
 Grupo 2: 9 ratones, 4×10^6 células RAJI + 1×10^6 LSP del donante 1
 Grupo 3: 7 ratones, 4×10^6 células RAJI + 5×10^6 LSP del donante 1
 Grupo 4: 6 ratones, 4×10^6 células RAJI + 1×10^6 LSP del donante 2
 Grupo 5: 7 ratones, 4×10^6 células RAJI + 5×10^6 LSP del donante 2

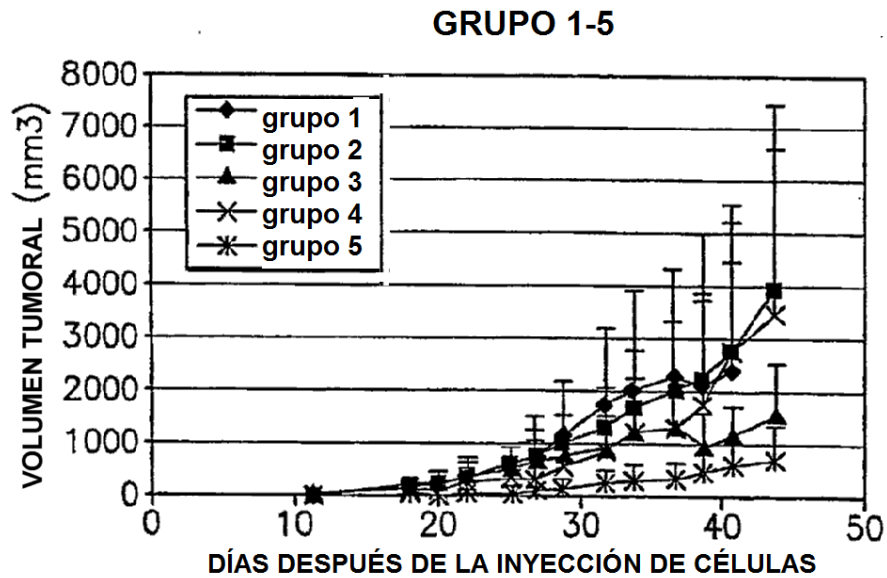


FIG. 17A

Grupo 6: 10 ratones, 4×10^6 células RAJI cada uno
 Grupo 7: 10 ratones, 4×10^6 células RAJI + 1×10^6 LSP del donante 3
 Grupo 8: 10 ratones, 4×10^6 células RAJI + 5×10^6 LSP del donante 3
 Grupo 9: 9 ratones, 4×10^6 células RAJI + 1×10^7 LSP del donante 3
 Grupo 10: 10 ratones, 4×10^6 células RAJI + 1×10^6 LSP del donante 4
 Grupo 11: 14 ratones, 4×10^6 células RAJI + 1×10^7 LSP del donante 4

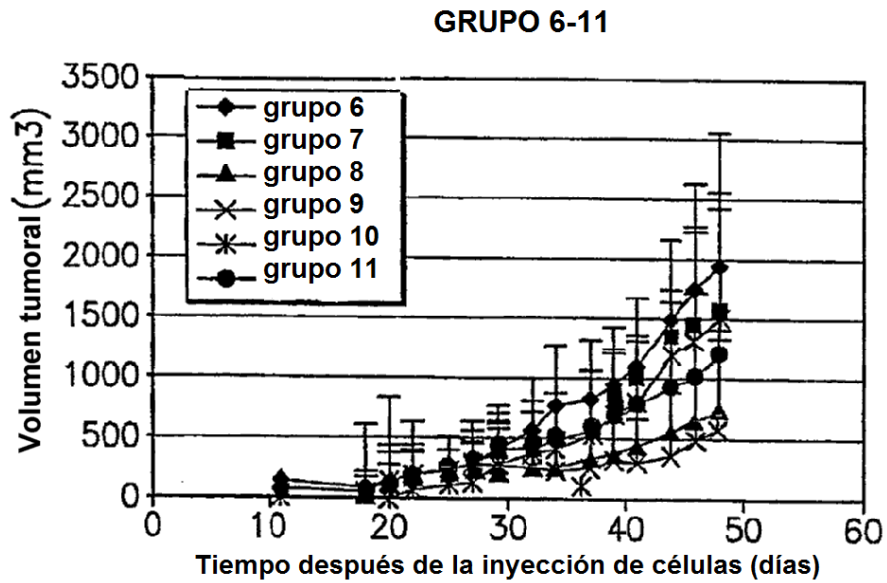
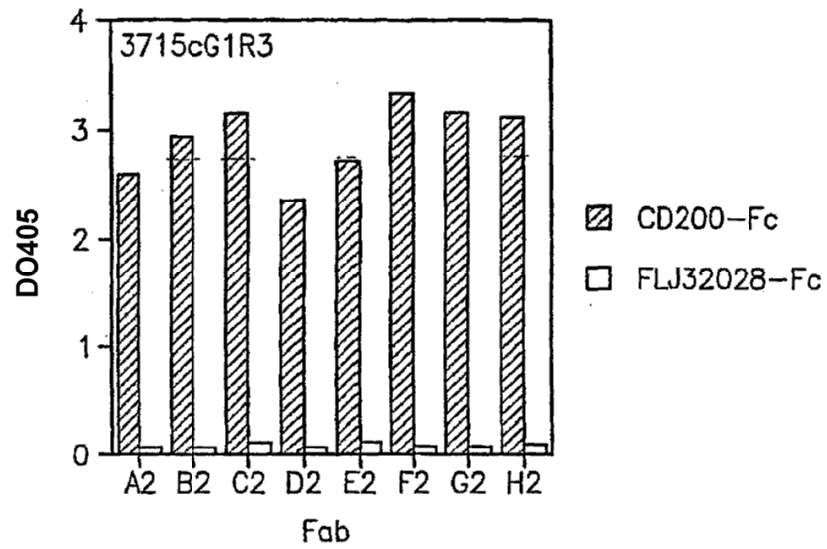


FIG. 17B

		Se proporcionan valores estadísticos p que comparan los grupos 2-4 con el grupo 1											Comparación grupos 7-11 con 6				
		grupo 1	grupo 2	grupo 3	grupo 4	grupo 5	grupo 7	grupo 8	grupo 9	grupo 10	grupo 11						
d22	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,0022	ns	ns	ns	ns	ns						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,0031											
d25	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,0093	<0,468	<0,865	<0,837	<0,055	<0,927						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,0766											
d27	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,0788	<0,416	<0,521	<0,83	<0,053	<0,588						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,014											
d29	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,038	<0,87	<0,564	<0,64	<0,0712	<0,936						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,036											
d32	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,014	<0,824	<0,123	<0,296	<0,31	<0,89						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,0121											
d34	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,017	<0,45	<0,0727	<0,057	<0,296	<0,427						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,0093											
d36	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,0197	<0,2	<0,0122	<0,0546	<0,1775	<0,145						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,025											
d39	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,0059	<0,41	<0,0207	<0,0095	<0,274	<0,26						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,035											
d41	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,0059	<0,575	<0,0144	<0,0073	<0,357	<0,245						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,0277											
d43	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,0328	<0,88	<0,0076	<0,0021	<0,327	<0,196						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,0022											
d45	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,0607	<0,653	<0,0099	<0,0025	<0,48	<0,059						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,064											
d48	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,0289	<0,4429	<0,0041	<0,0012	<0,3459	<0,0566						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,0309	<0,445	<0,0055	<0,0069	<0,341	<0,0359						
d50	Pruebat Welch	ns	ns	ns	ns	<0,0502	<0,315	<0,0076	<0,0073	<0,2775	<0,05						
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,0023											
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,0257											
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,0438											
	Wilcox	ns	ns	ns	ns	<0,004	<0,4	<0,0106	<0,0142	<0,35	<0,082						

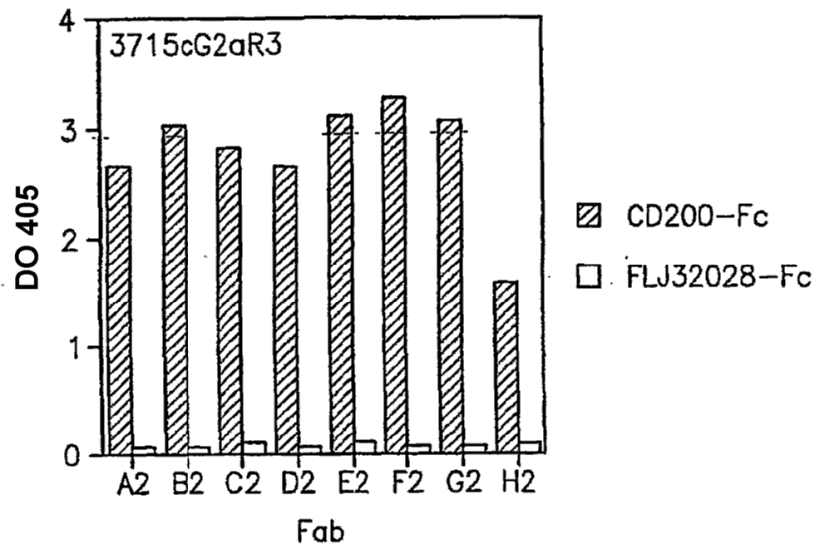
ns = no significativo
los grupos significativos se muestran en rojo

FIG. 18



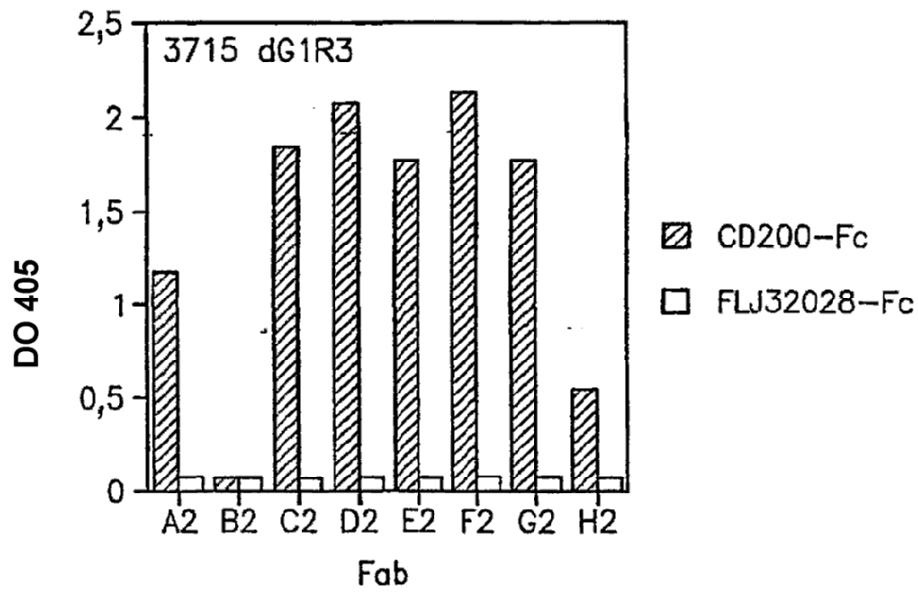
Resultados de ELISA de clones de kappa del IgG1 representativos después de la ronda 3 de selección en CD200-Fc capturado en anticuerpo anti Fc de IgG de ratón en cabra

FIG. 19A



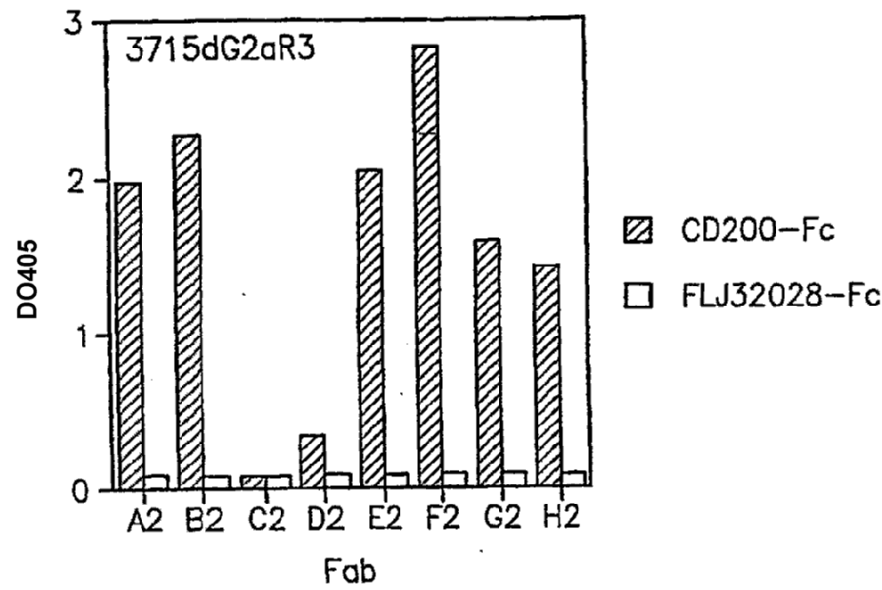
Resultados de ELISA de clones de kappa de IgG2a representativos después de la ronda 3 de selección en CD200-Fc capturado en anticuerpo anti Fc de IgG de ratón en cabra

FIG. 19B



Resultados de ELISA de clones de kappa de IgG1 representativos después de la ronda 3 de selección sobre CD200-Fc recubierta de forma directa sobre pocillos de microtitulación

FIG. 19C



Resultados de ELISA de clones de kappa de IgG2a representativos después de la ronda 3 de selección sobre CD200-Fc recubierta de forma directa sobre pocillos de microtitulación

FIG. 19D

Resultados de citometría de flujo de clones de IgG1 representativos seleccionados sobre CD200-Fc capturada con anti Fc de IgG de ratón en cabra

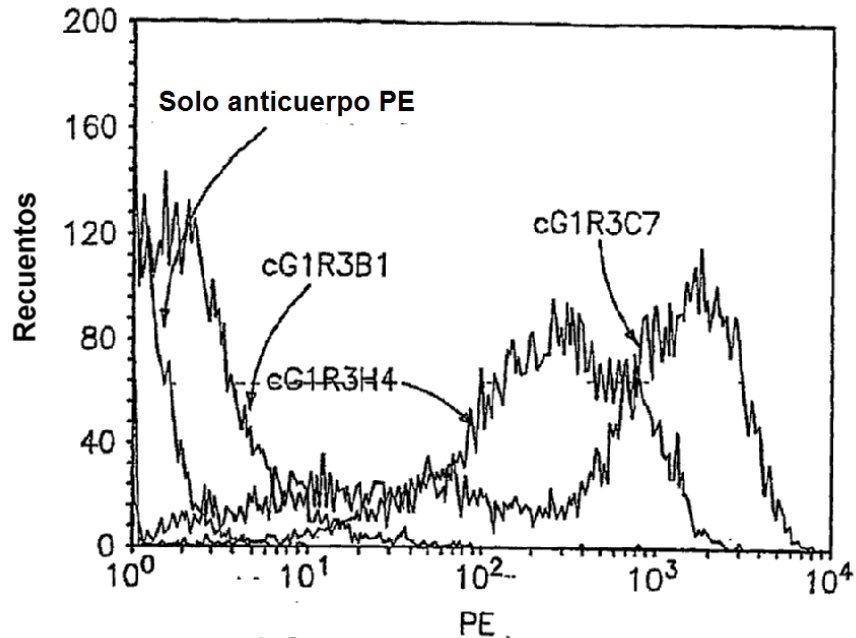


FIG. 20A

Resultados de citometría de flujo de clones de IgG2 representativos seleccionados sobre CD200-Fc capturada con anti Fc de IgG de ratón en cabra

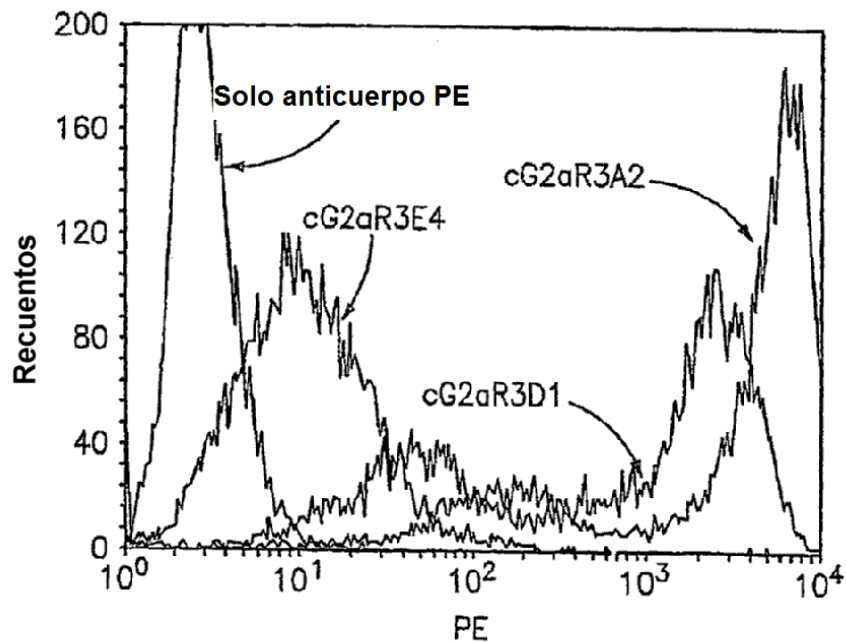


FIG. 20B

Resultados de citometría de flujo de clones de IgG1 representativos seleccionados sobre CD200-Fc recubierta de forma directa

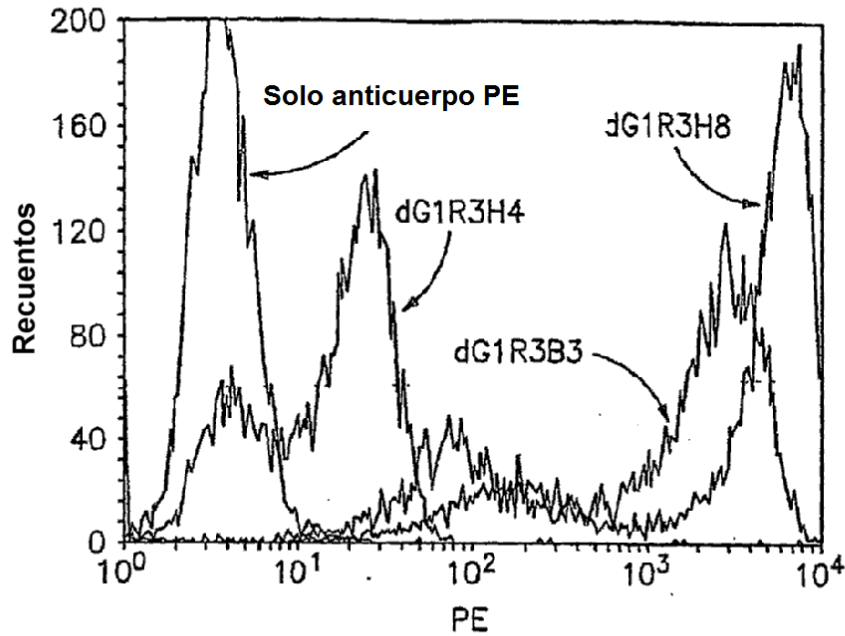


FIG. 20C

Resultados de citometría de flujo de clones de IgG2a representativos seleccionados sobre CD200-Fc recubierta de forma directa

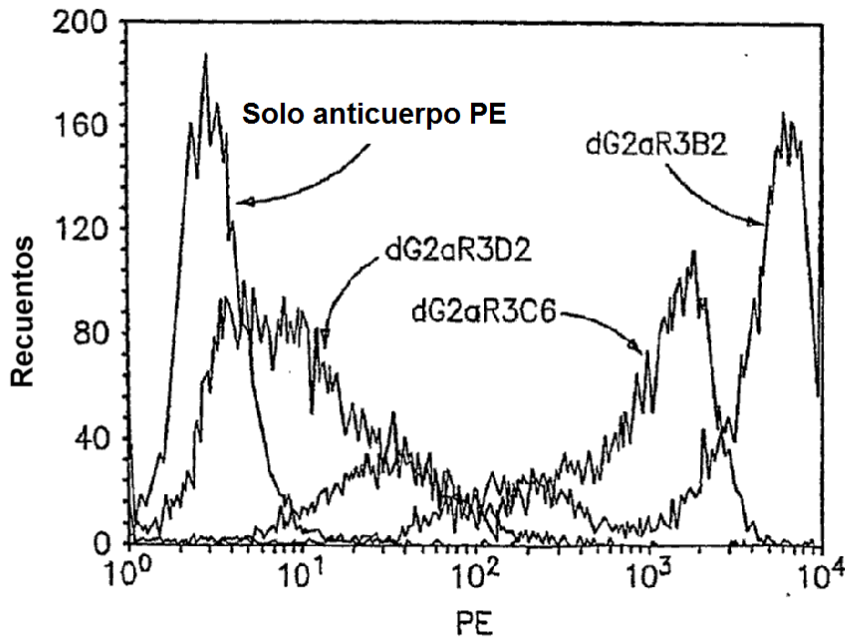


FIG. 20D

Secuencia de aminoácidos deducida de las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada de clones específicos para CD200

Seq#	CDRH1	CDRH2	CDRH3	Fab	media geo *
A1	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WID?ENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:117)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3A2	291,8
B1	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WID?ENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:117)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3A3	486,15
C1	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WID?ENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:117)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3A4	340,61
B2	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3B3	131,84
E2	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3B6	576,09
G2	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3B9	407,58
A3	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3B12	363,52
C3	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:112)	WIDPE?DDTKYAPKFG (SEQ ID NO:119)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3C2	271,55
D3	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3C3	452,53
F3	GLNIKDYMH (SEQ ID NO:113)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:120)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3C6	505,75
A5	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG2AR3A9	1684,92
A6	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG2AR3B5	1819,42
B7	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:114)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:121)	KNYVSDYNYFDV (SEQ ID NO:132)	DG1R3A2	1325
D7	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:114)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:122)	KNYVSDYNYFDV (SEQ ID NO:132)	DG1R3A4	1245
E7	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:133)	DG1R3A5	1969
G7	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:115)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	DG1R3A7	1486
H7	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	DG1R3A8	1852
C8	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	DG1R3A12	981,26
D8	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	DG1R3B2	488,59
E8	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	DG1R3B3	790,06
D9	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	DG1R3B11	1328
E9	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	DG1R3B12	1333
F9	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	DG1R3C1	1782,8
F1	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENGDTKYAPKFG (SEQ ID NO:118)	KNYVSNYNYFDV (SEQ ID NO:131)	CG1R3A9	505,72

* Media geométrica de la señal de citometría de flujo

FIG. 21a

Secuencia de aminoácidos deducida de las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada de clones específicos para CD200

Seq#	CDRH1	CDRH2	CDRH3	Fab	media geo*
A4	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDVTKNNEKFRG (SEQ ID NO:123)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	cG2aR3A1	?
E4	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDVTKNNEKFRG (SEQ ID NO:123)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	cG2aR3A5	2146,54
G4	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDVTKNNEKFRG (SEQ ID NO:123)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	cG2aR3A7	586,74
C12	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDVTKNNEKFRG (SEQ ID NO:123)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3B9	1563,74
D11	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDVTKNNEKFRG (SEQ ID NO:123)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3B1	1942,44
D12	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDVTKNNEKFRG (SEQ ID NO:123)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3B10	1668,3
B4	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDVTKNNEKFRG (SEQ ID NO:124)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	cG2aR3A2	2244,57
B12	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDVTKNNEKFRG (SEQ ID NO:124)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3B8	1281,05
E6	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDGSKYNEKFKG (SEQ ID NO:125)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	cG2aR3B9	1351,49
D4	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO:126)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	cG2aR3A4	2004,46
C11	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO:126)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3A1	1315,64
A10	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO:127)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3A1	2043,86
B10	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO:127)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3A2	2179,3
A12	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO:127)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3B6	1625,73
F10	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO:128)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3A7	1814,85
E11	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO:129)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3B2	2272,54
H10	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO:129)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3A9	1526,7
F11	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:116)	YINPYNDVTKNNEKFRG (SEQ ID NO:130)	KRGYDGAWFAY (SEQ ID NO:134)	dG2aR3B3	1882,28

* Media geométrica de la señal de citometría de flujo

FIG. 21a (Cont.)

Secuencia de aminoácidos deducida de las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada de clones específicos para CD200

Seq#	CDRH1	CDRH2	CDRH3	Fab	media geo *
D2	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:135)	WIDPENEDTYAPKFG	(SEQ ID NO:154) FNGYIANDY	(SEQ ID NO:178) CGIRJB5	299,95
A7	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:135)	WIDPENEDTYAPKFG	(SEQ ID NO:154) FNGYIANDY	(SEQ ID NO:178) dGIRJA1	2075
C7	AFNIKDYMH (SEQ ID NO:136)	WIDPENEDTYAPKFG	(SEQ ID NO:154) FNGYIANDY	(SEQ ID NO:179) dGIRJA3	624,84
A8	AFNIKDYMH (SEQ ID NO:136)	WIDPESGDYAPKFG	(SEQ ID NO:155) FNGYIANDY	(SEQ ID NO:180) dGIRJA9	1490
B5	AFNIKDYMH (SEQ ID NO:136)	WIDPESGDYAPKFG	(SEQ ID NO:155) FNGYIANDY	(SEQ ID NO:181) CG2AR3A10	1386,23
H3	AFNIKDYMH (SEQ ID NO:136)	WIDPESGDYAPKFG	(SEQ ID NO:155) FNGYIANDY	(SEQ ID NO:182) CGIRJC8	399,21
B8	AFNIKDYMH (SEQ ID NO:136)	WIDPESGDYAPKFG	(SEQ ID NO:155) FNGYIANDY	(SEQ ID NO:181) dGIRJA11	929,91
B6	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:137)	WIDPENEDTYAPKFG	(SEQ ID NO:156) RNEYTYNDY	(SEQ ID NO:183) CG2AR3B6	1564,28
E5	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENEDTYAPKFG?	(SEQ ID NO:157) RNEYTYNDY	(SEQ ID NO:184) CG2AR3B1	1751,43
E12	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:111)	WIDPENEDTYAPKFG	(SEQ ID NO:156) RNEYTYNDY	(SEQ ID NO:183) dG2AR3B11	1452,43
A11	GFNIKDYMH (SEQ ID NO:137)	WIDPENEDTYAPKFG	(SEQ ID NO:158) RNEYTYNDY	(SEQ ID NO:183) dG2AR2A10	1668,3
H8	AFNIKDYMH (SEQ ID NO:136)	WIDPESGDYAPKFG	(SEQ ID NO:159) FNGYIANDY	(SEQ ID NO:181) dGIRJB6	1513
D1	GYTFDYLH (SEQ ID NO:138)	TIDTSTGYGKPKG	(SEQ ID NO:160) GGNVYVFAY	(SEQ ID NO:185) CGIRJA6	448,43
E1	GFTFSAAMD (SEQ ID NO:139)	EIRSLANHAITYAESVKG	(SEQ ID NO:161) NGYDDGVPDY	(SEQ ID NO:186) CGIRJA7	393,89
G1	GYTFEYTMH (SEQ ID NO:140)	GYNPNNGALYNKPKG	(SEQ ID NO:162) RSNRYDDANDY	(SEQ ID NO:187) CGIRJA10	274,99
A2	GFTFSGFAMS (SEQ ID NO:141)	SISGGGTYTLDVKG	(SEQ ID NO:163) GNTYSGTSYDY	(SEQ ID NO:188) CGIRJB2	476,04
G3	GFTFSGFAMS (SEQ ID NO:141)	SISGGGTYTLDVKG	(SEQ ID NO:163) GNTYSGTSYDY	(SEQ ID NO:188) CGIRJC7	638,59
F7	GFTFSGFAMS (SEQ ID NO:141)	SISGGGTYTLDVKG	(SEQ ID NO:163) GNTYSGTSYDY	(SEQ ID NO:188) dGIRJA6	1665
A9	GFTFTGYAMS (SEQ ID NO:142)	SISGGGSATYPSVKG	(SEQ ID NO:164) GNTYSGTSYDY	(SEQ ID NO:188) dGIRJB7	1994
B9	GFTFSGFAMS (SEQ ID NO:141)	SISGGGTYTLDVKG	(SEQ ID NO:163) GNTYSGTSYDY	(SEQ ID NO:188) dGIRJB9	1569
C9	GFTFSGFAMS (SEQ ID NO:141)	SISGGGTYTLDVKG	(SEQ ID NO:163) GNTYSGTSYDY	(SEQ ID NO:188) dGIRJB10	1839
G9	GFTFSGFAMS (SEQ ID NO:141)	SISGGGTYTLDVKG	(SEQ ID NO:163) GNTYSGTSYDY	(SEQ ID NO:188) dGIRJC2	1586
C2	GFNIKDYTH (SEQ ID NO:114)	WIDPEIGATKYVFKFG	(SEQ ID NO:165) LYGNRYDYANDY	(SEQ ID NO:189) CGIRJB4	385,24
G8	GFNIKDYTH (SEQ ID NO:114)	WIDPEIGATKYVFKFG	(SEQ ID NO:165) LYGNRYDYANDY	(SEQ ID NO:189) dGIRJB5	1451

* Media geométrica de la señal de citometría de flujo

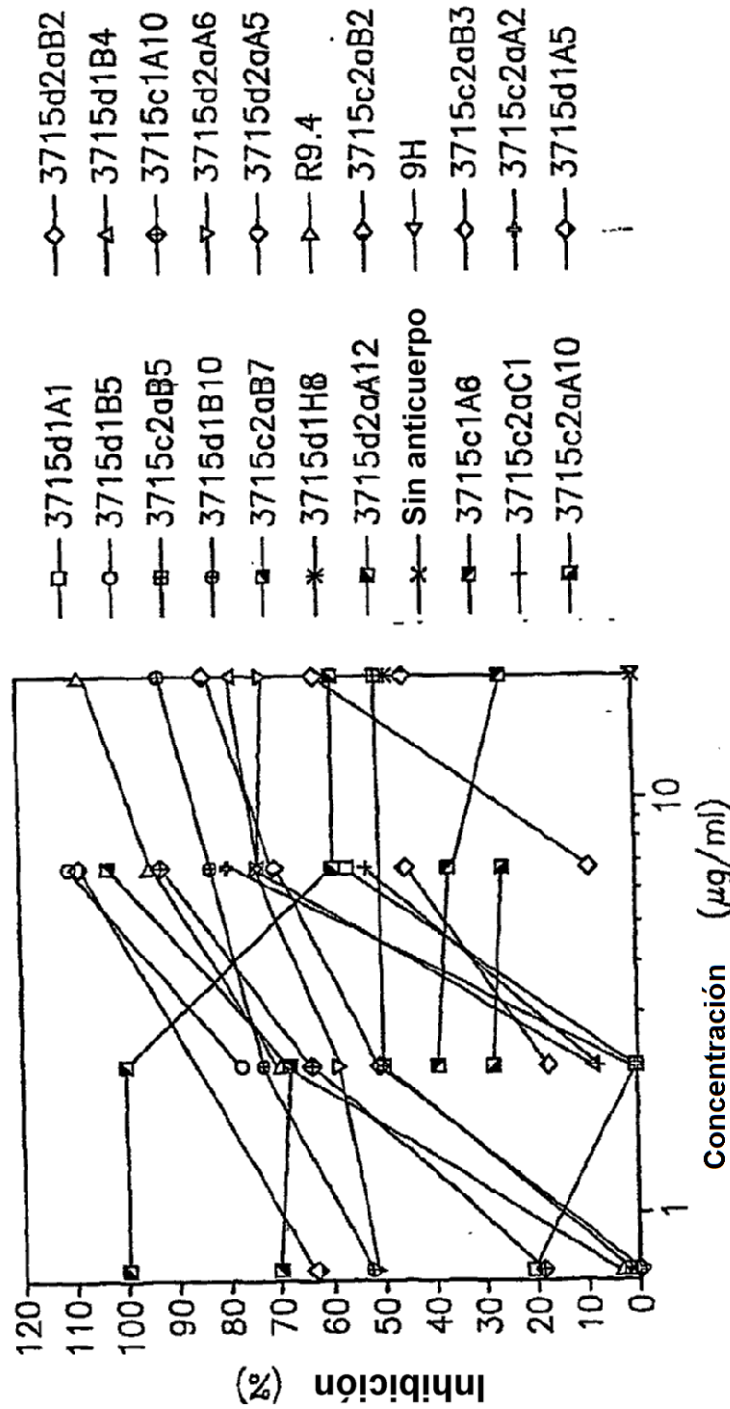
FIG. 21b

Secuencia de aminoácidos deducida de las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada de clones específicos para CD200

Seq#	CDRH1	CDRH2	CDRH3	Fab	media geo*
F2	GFTFSHAMS (SEQ ID NO:143)	SISGGGTYTPNSVKGR (SEQ ID NO:166)	RGYTRYPAMDY (SEQ ID NO:190)	CG1R3B7	415,38
H2	GFTFSHAMS (SEQ ID NO:143)	SISGGGTYTPNSVKGR (SEQ ID NO:166)	RGYTRYPAMDY (SEQ ID NO:190)	CG1R3B10	109,14
E3	GFTFSHAMS (SEQ ID NO:143)	SISGGGTYTPNSVKGR (SEQ ID NO:166)	RGYTRYPAMDY (SEQ ID NO:190)	CG1R3C4	589,64
H4	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:144)	GINPENNGYISYNQKFKG (SEQ ID NO:167)	MITTGYHYANDY (SEQ ID NO:191)	CG2AR3A8	682,7
H5	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:144)	GINPENTGGYISYNQKFKG (SEQ ID NO:168)	MITTGYHYANDY (SEQ ID NO:191)	CG2AR3B4	711,01
F6	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:144)	GINPENTGGYISYNQKFKG (SEQ ID NO:168)	MITTGYHYANDY (SEQ ID NO:191)	CG2AR3B10	737,93
G6	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:144)	GINPENNGYISYNQKFKG (SEQ ID NO:167)	MITTGYHYANDY (SEQ ID NO:191)	CG2AR3B12	278,53
C10	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:144)	GINPENTGGYISYNQKFKG (SEQ ID NO:168)	MITTGYHYANDY (SEQ ID NO:191)	CG2AR3A4	814,16
D10	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:144)	GINPENTGGYISYNQKFKG (SEQ ID NO:169)	MITTGYHYANDY (SEQ ID NO:191)	CG2AR3A5	421,7
G12	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:144)	GINPENTGGYISYNQKFKG (SEQ ID NO:168)	MITTGYHYANDY (SEQ ID NO:191)	CG2AR3C1	1068,43
H12	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:144)	GINPENTGGYISYNQKFKG (SEQ ID NO:168)	MITTGYHYANDY (SEQ ID NO:191)	CG2AR3C	1106,7
C5	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:145)	WISPGSLNTNNEKFRG (SEQ ID NO:169)	KARGDSGANFAY (SEQ ID NO:192)	CG2AR3A11	1311,44
D5	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:146)	WISPGSLNTNNEKFRG (SEQ ID NO:169)	KARGDSGANFAY (SEQ ID NO:192)	CG2AR3A12	887,54
B11	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:146)	WISPGSLNTNNEKFRG (SEQ ID NO:169)	KARGDSGANFAY (SEQ ID NO:192)	CG2AR3A11	1588,4
F5	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:147)	AIDTFDSNTXNQKFKG (SEQ ID NO:170)	GVDY (SEQ ID NO:193)	CG2AR3B2	1491,49
G10	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:147)	AIDTFDSNTXNQKFKG (SEQ ID NO:171)	GVDY (SEQ ID NO:193)	CG2AR3A8	1424,53
H11	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:147)	AIDTFDSNTXNQKFKG (SEQ ID NO:172)	GVDY (SEQ ID NO:193)	CG2AR3B5	1759,43
G5	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:148)	TIDASDRYISYNQKFKG (SEQ ID NO:173)	LEGSGGQFAY (SEQ ID NO:194)	CG2AR3B3	1389,19
F8	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:148)	TIDASDRYISYNQKFKG (SEQ ID NO:173)	LEGSGGQFAY (SEQ ID NO:194)	CG1R3B4	1340
C6	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:149)	HIDPYTGSSNWNLEKFKG (SEQ ID NO:174)	SKRDYFNY (SEQ ID NO:195)	CG2AR3B7	1776,38
H6	GFNIXDSYIH (SEQ ID NO:150)	WIDPENGSTYAPKFKG (SEQ ID NO:175)	CNFVGNPFYDY (SEQ ID NO:196)	CG2AR3C1	1833,02
F12	GFNIXDSYIH (SEQ ID NO:151)	WIDPENGSTYAPKFKG (SEQ ID NO:175)	CNFVGNPFYDY (SEQ ID NO:197)	CG2AR3B12	1350,25
H9	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:152)	YINPSSGTYTNQKFKD (SEQ ID NO:176)	RPMITAGANFAY (SEQ ID NO:198)	CG1R3H8	2470
E10	GYTFEFTMH (SEQ ID NO:153)	GINPNTGAYNINQKFKG (SEQ ID NO:177)	ITTVVGYYANDY (SEQ ID NO:199)	CG2AR3A6	796,81

* Media geométrica de la señal de citometría de flujo

FIG. 21b (Cont.)



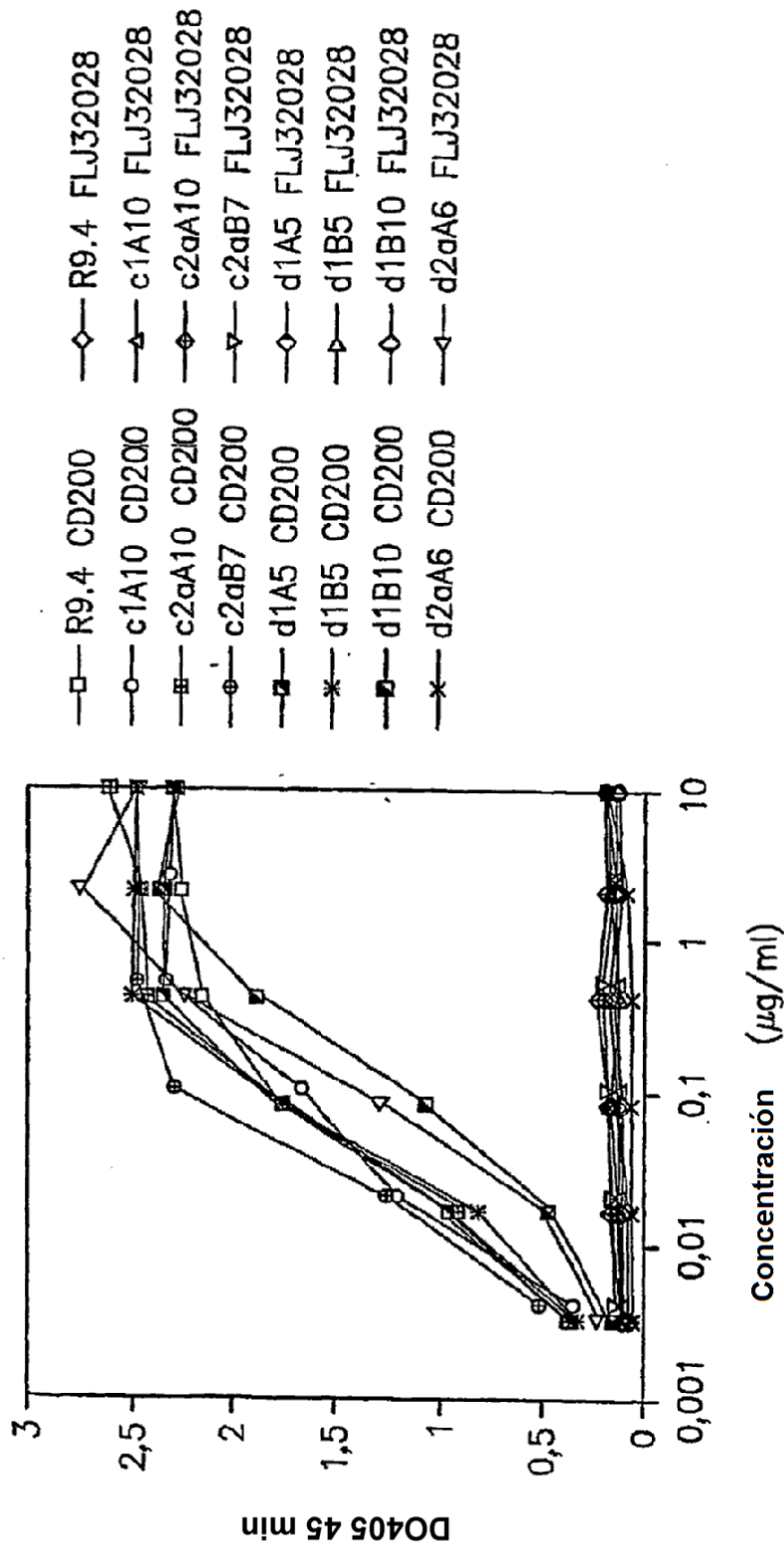
R9.4 es un anticuerpo quimérico obtenido de un scFv9 de conejo. 9H es un anticuerpo anti FLJ32028 y se incluyó como un control negativo

FIG. 22

Secuencias de aminácidos deducidas de los Fab de CD200 seleccionados para quimerización

Cadena pesada						
Fab	RM1	CDR1	RM2	CDR2		
	d1B10	LEVKLVEGGGLVKPGGSLKLSCAAS	GFTFSGFAMS	WVRQTPKRIEWA	SISGGTTYILDSVKG	(SEQ ID NO: 200)
	d1A5	LEVQLQOQGAELVRSGASVKLSCTAS	GFNIKDYIMH	WVKORPEQGLEWIG	WIDPENGDTKYAPKFG	(SEQ ID NO: 201)
	d1B5	LEVQLQOQGAELVRSGASVKLSCKAS	GFNIKDYIYH	WVKORPEQGLEWIG	WIDPEIGATKYVPKFG	(SEQ ID NO: 202)
	c2aB7	LEVQLQOQSGPELVKPGASVKLSCKAS	GYSTFDYIIL	WVKQNHGKSLEWIG	HIDPYYGSSNYLNKFKG	(SEQ ID NO: 203)
	c1A10	LEVQLQOQSGPELVKPGASVKLSCKTS	GYTFTEYTMH	WVKQSHGKSLEWIG	GVNPNMNGGALYNQKFKG	(SEQ ID NO: 204)
	c2aA10	LEVQLQOQGAELVRSGASVKLSCTAS	AFNIKDHVMH	WVKORPEQGLEWIG	WIDPESGDTKYAPKFG	(SEQ ID NO: 205)
Fab	RM3	CDR3	RM4			
	d1B10	RFITISRDIAARNILYLQMSLSLRSSEDTAMYYCAR	GNYSGTSYDY	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO: 200 - cont.)	
	d1A5	KATMTADTSSNTAYLQLSLTSSEDTAVYYCNA	KNYYVSNYNFFDV	WGAGTTVTVSS	(SEQ ID NO: 201 - cont.)	
	d1B5	KATMTDTSSNTAYLQLSLTSSEDTAVYYCNA	LYGNYDRIYAMDY	WGQGTSTVTSS	(SEQ ID NO: 202 - cont.)	
	c2aB7	KATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCGR	SKRDYFDY	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO: 203 - cont.)	
	c1A10	KATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDSAVYYCAR	RSNRYDDAMDY	WGQGTSTVTSS	(SEQ ID NO: 204 - cont.)	
	c2aA10	KATMTADISSNTAYLQLNSLTSEDTAVYYCNA	FNQYQALDQ	WGQGTSTVTSS	(SEQ ID NO: 205 - cont.)	
Cadenas ligeras						
Fab	RM1	CDR1	RM2	CDR2		
	d1B10	SRDIVLTQSPASLAVALSLGQRATISC	RASESVDSYGNSEFMH	WYQKPGQPPKLLIY	RASNLES	(SEQ ID NO: 206)
	d1A5	SREIVLTQSPATMSASPGKVTMTIC	SASSSVRYMY	WYQKSTSPKLIWY	DTSKLAS	(SEQ ID NO: 207)
	d1B5	SRDIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC	KASQNVRTAVA	WYQKPGQSPKALIY	LASNRHT	(SEQ ID NO: 208)
	c2aB7	SRDIQMTQSPSSMYASLGERVTITC	KASQDINSYLS	WFQKPGKSPKTIY	RANRLVD	(SEQ ID NO: 209)
	c1A10	SRDVVMTQTPLTSLVLTIGQPASISC	KSSQSLDIDEKTYLN	WFLQRPQSPKRLIY	LVSKLDS	(SEQ ID NO: 210)
	c2aA10	SREIVLTQSPAIMSASLGERVTMTIC	TASSSVSSSYLH	WYQKPGSSPKLIWY	STSNLAS	(SEQ ID NO: 211)
Fab	RM3	CDR3	RM4			
	d1B10	GIPARFSGSGSRDTFTLTINPVEADDAVATYIC	QQSNEDPRT	FGGGTKLEIKR	(SEQ ID NO: 206 - cont.)	
	d1A5	GVPGRFSGSGSGNSYSLTISSEAEADVAATYIC	FQSGGYPLT	FGSGTKLEIKR	(SEQ ID NO: 207 - cont.)	
	d1B5	GVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFC	LQHWNYPLT	FGAGTKLELXR	(SEQ ID NO: 208 - cont.)	
	c2aB7	GVPSRFSGSGSQDYSLTISSEYEDMGIIYIC	LOYDEFFPT	FGGGTKLEIKR	(SEQ ID NO: 209 - cont.)	
	c1A10	GVPDRFTGSGSGTDFLTIKISRVEAEDLGVIYIC	WQGTHTFPQT	FGGGTKLEIKR	(SEQ ID NO: 210 - cont.)	
	c2aA10	GVPARFSGSGSGTSLTISSEAEADAATYIC	ROYHRSPPIFT	FGSGTKLEIKR	(SEQ ID NO: 211 - cont.)	

FIG. 23



Resultados de ELISA de IgG química obtenidas de sobrenadantes de cultivo de una transfección transitoria de pequeña escala

FIG. 24

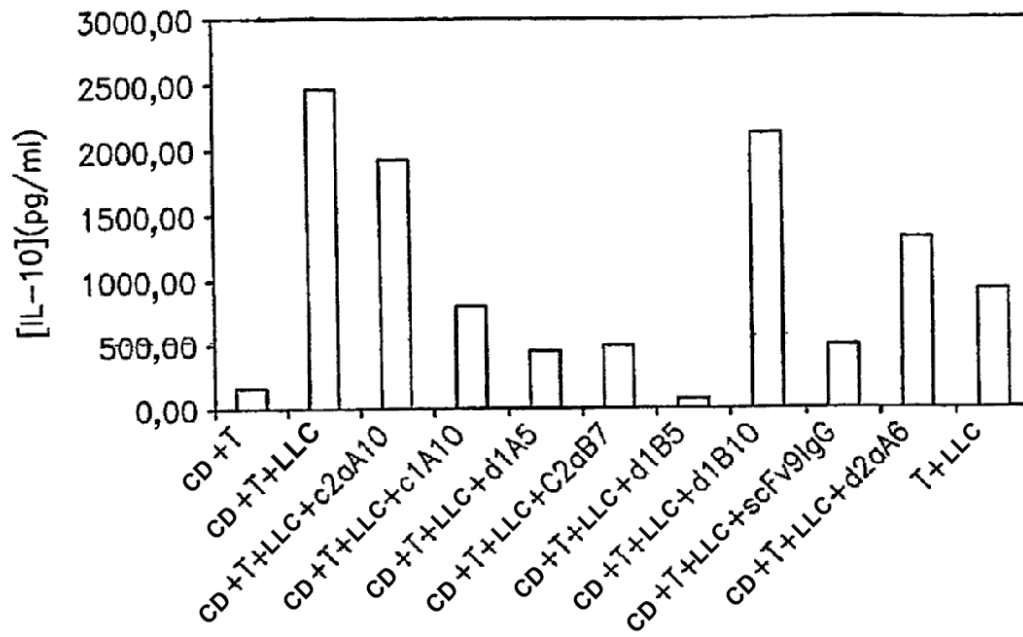


FIG. 26C

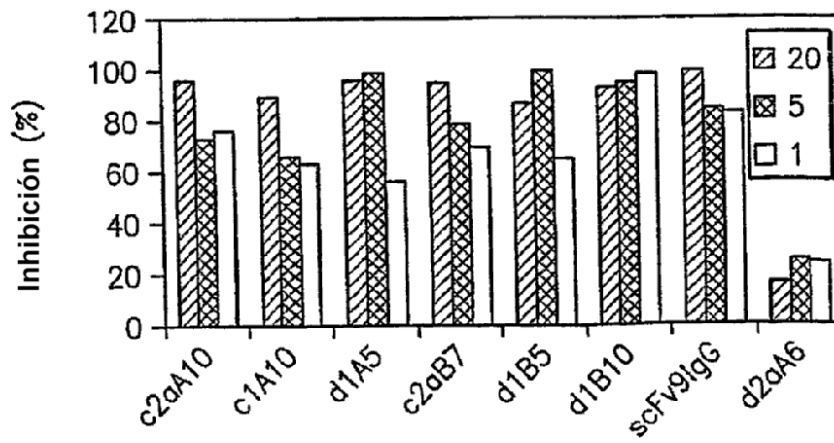


FIG. 25

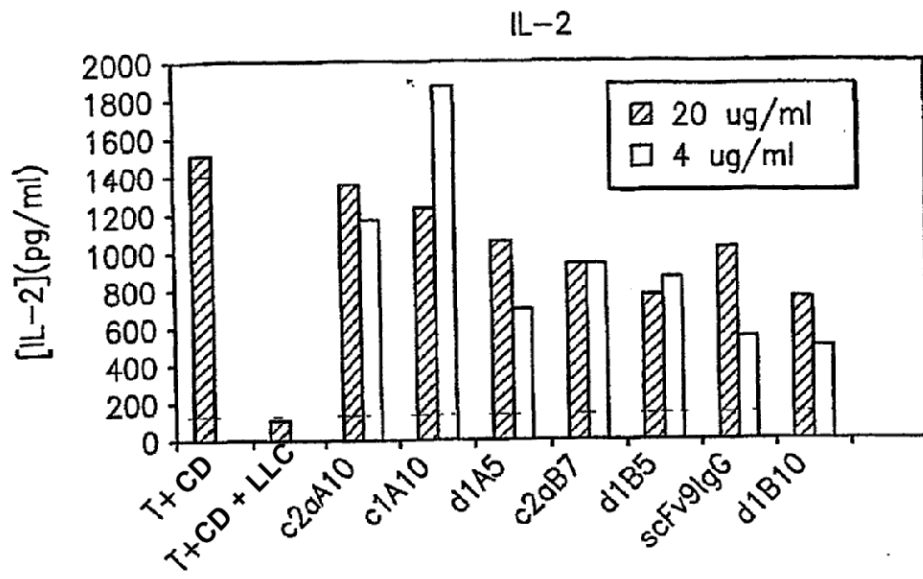


FIG. 26A

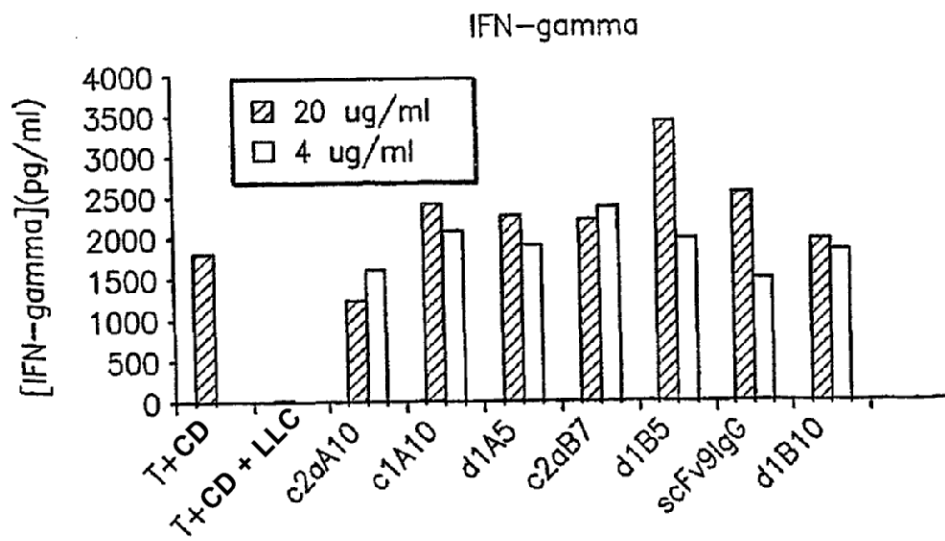


FIG. 26B

**Actividad ADCC de anticuerpos de
CD200 quiméricos**

(E:T= 50:1; conc. Ac = 20ug/ml)

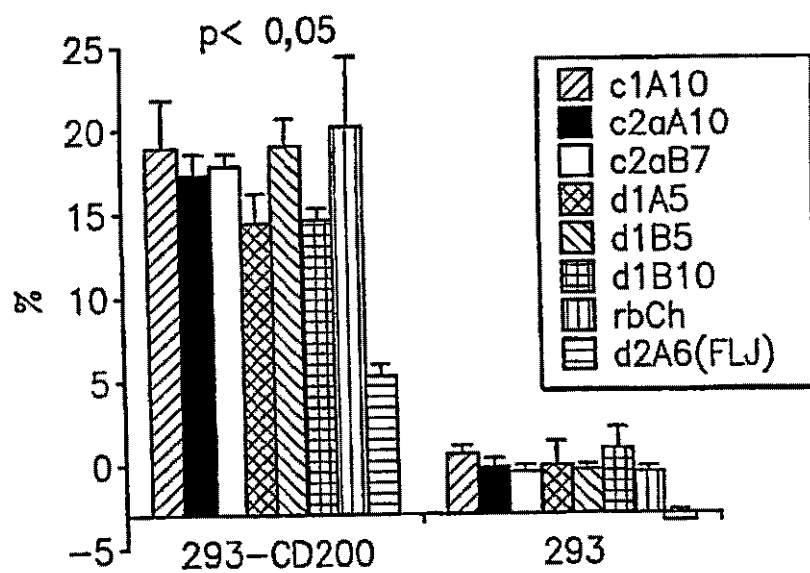


FIG. 27

MODELO RAJI/LSP

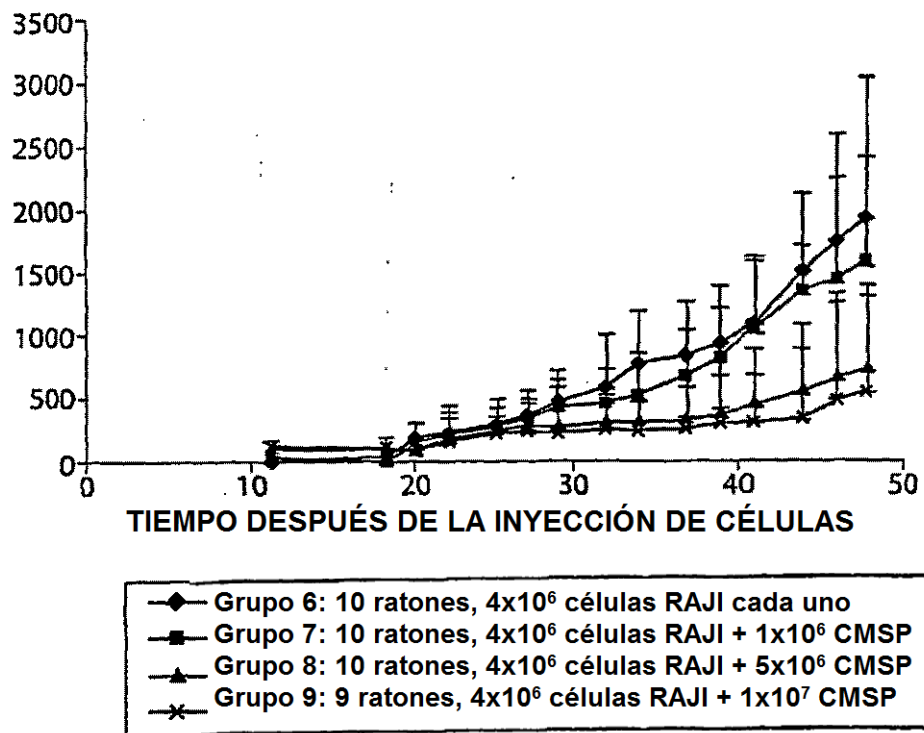


FIG. 28

MODELO NAMALWA/LSP

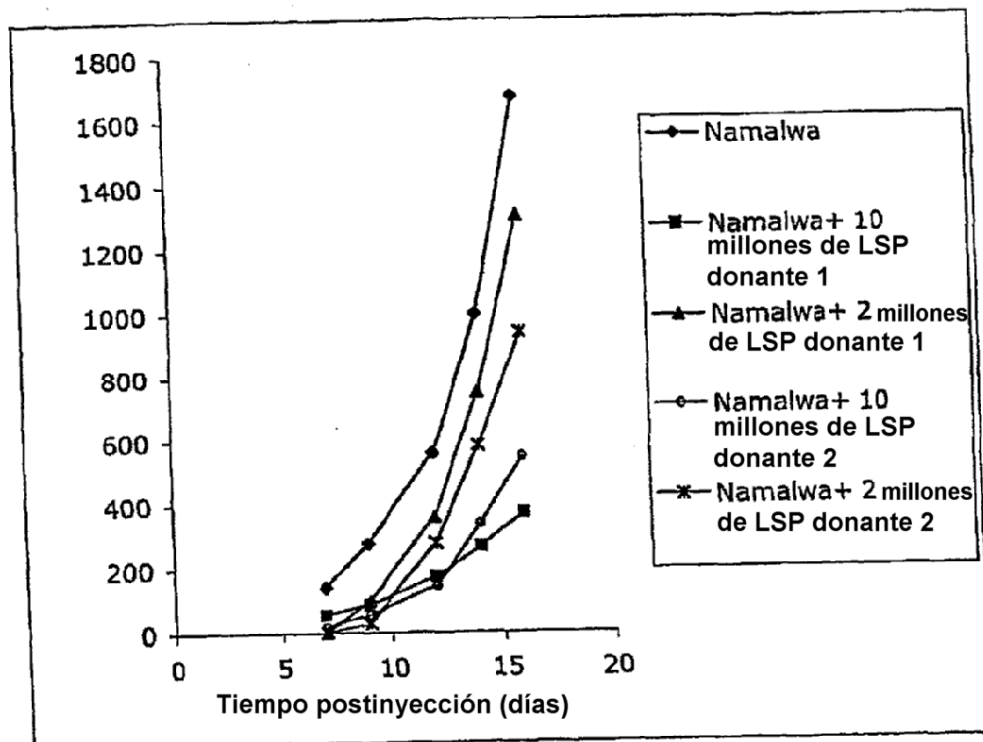


FIG. 29

Efecto inmunosupresor de CD200 en el modelo RAJI/LSP

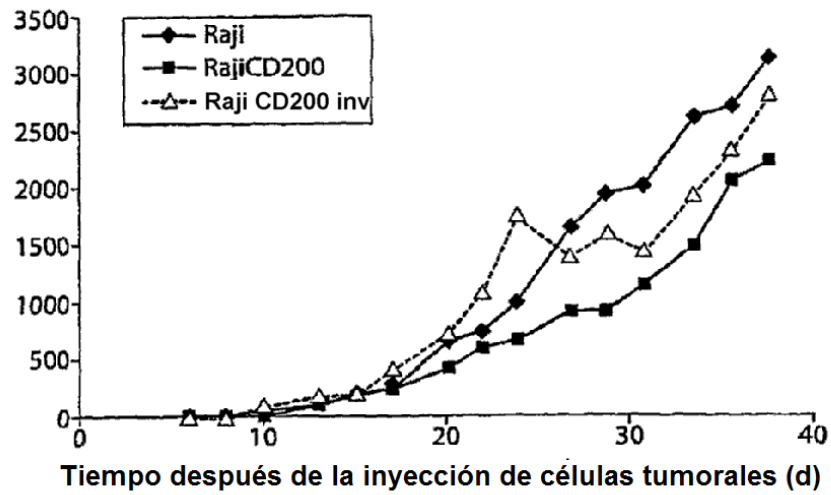


FIG. 30a

Efecto inmunosupresor de CD200 en el modelo RAJI/LSP

RAJICD200INV

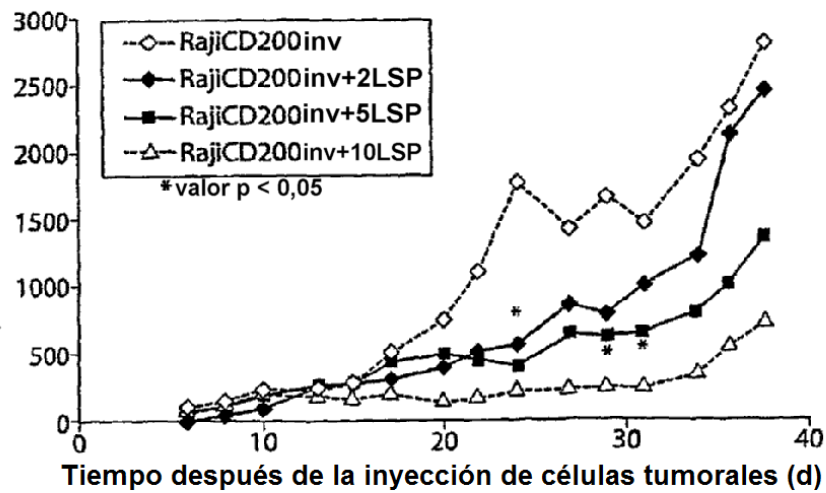


FIG. 30b

Efecto inmunosupresor de CD200 en el modelo RAJI/LSP

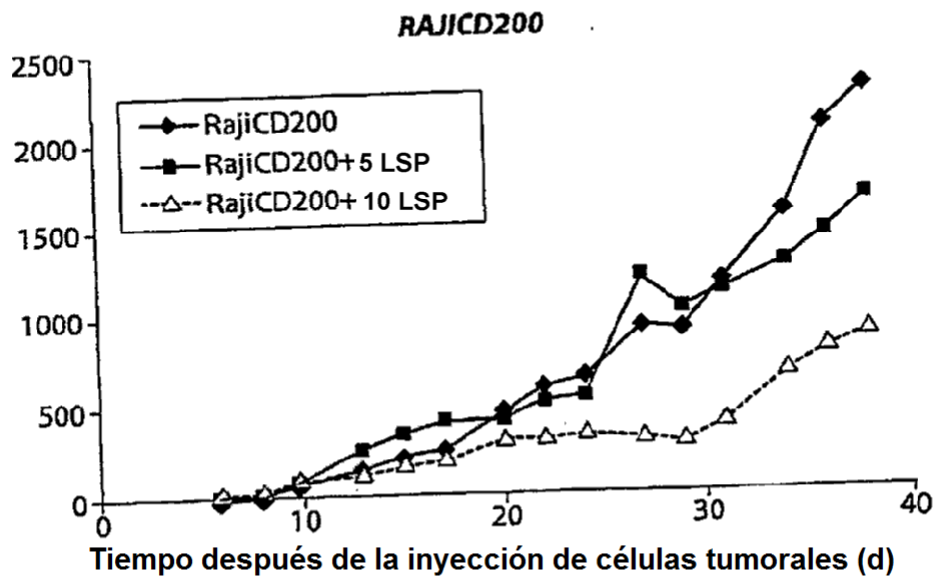


FIG. 30c

EFEECTO INMUNOSUPRESOR DE CD200 EN EL MODELO NAMALWA/LSP

Comparación de las células transducidas con lentivirus con las células parentales

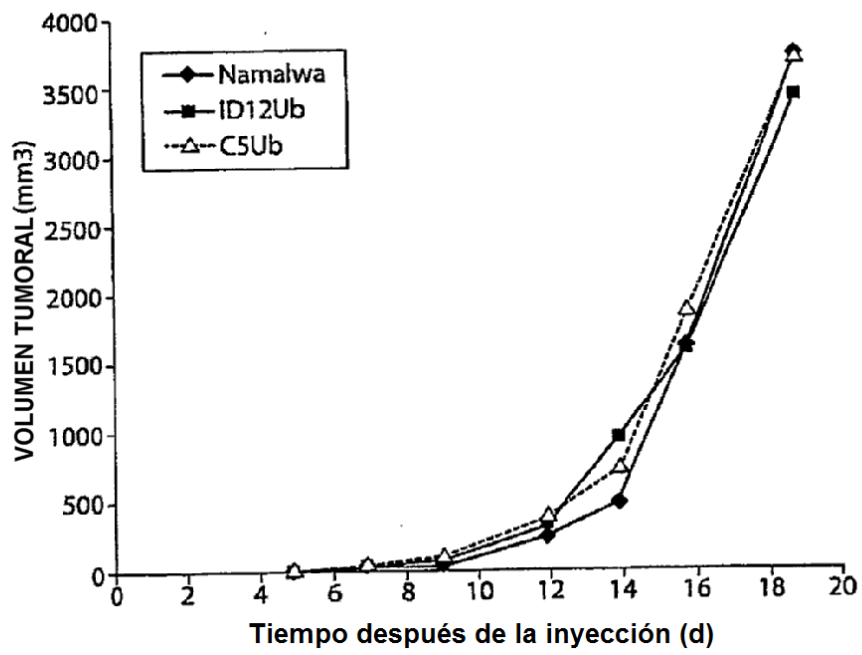


FIG. 31a

EFFECTO INMUNOSUPRESOR DE CD200 EN EL MODELO NAMALWA/LSP

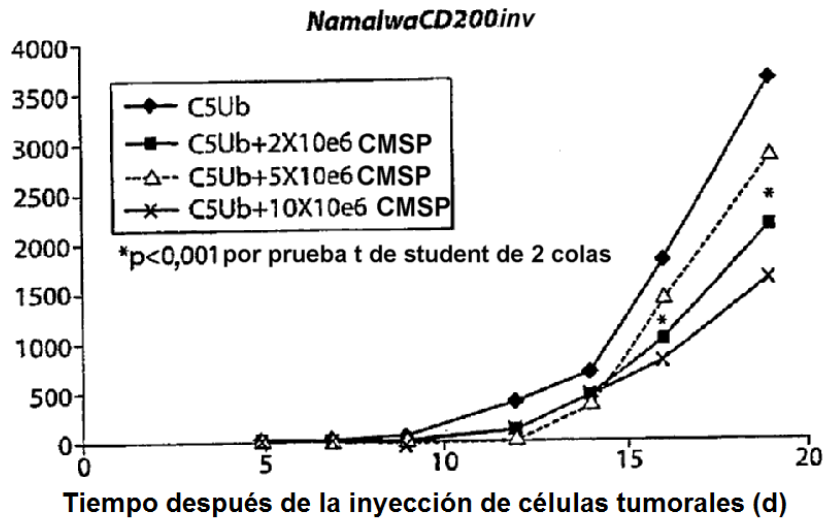


FIG. 31b

EFFECTO INMUNOSUPRESOR DE CD200 EN EL MODELO NAMALWA/LSP

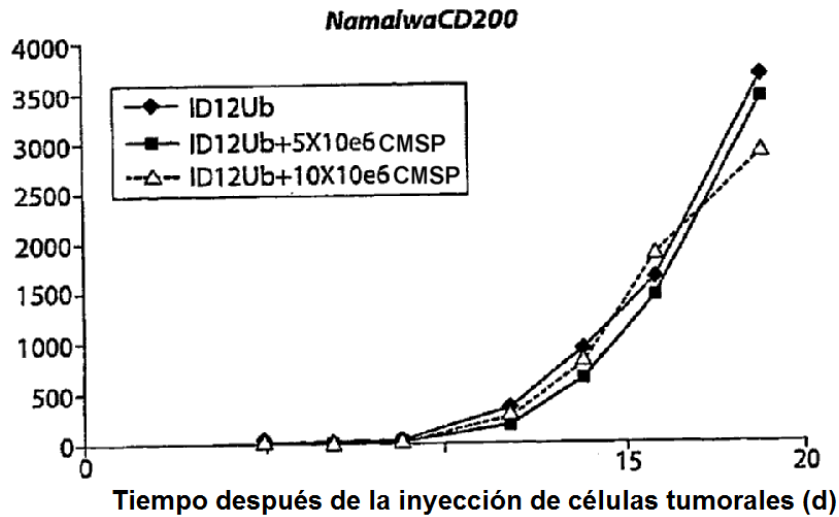
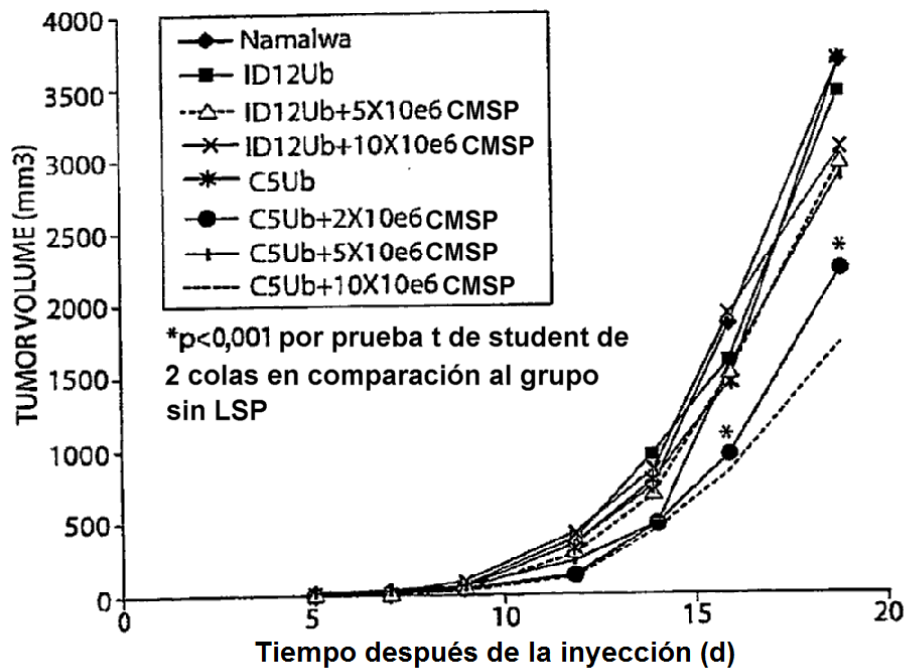


FIG. 31c

EFFECTO INMUNOSUPRESOR DE CD200 EN EL MODELO NAMALWA/LSP*Todos los grupos***FIG. 31d**

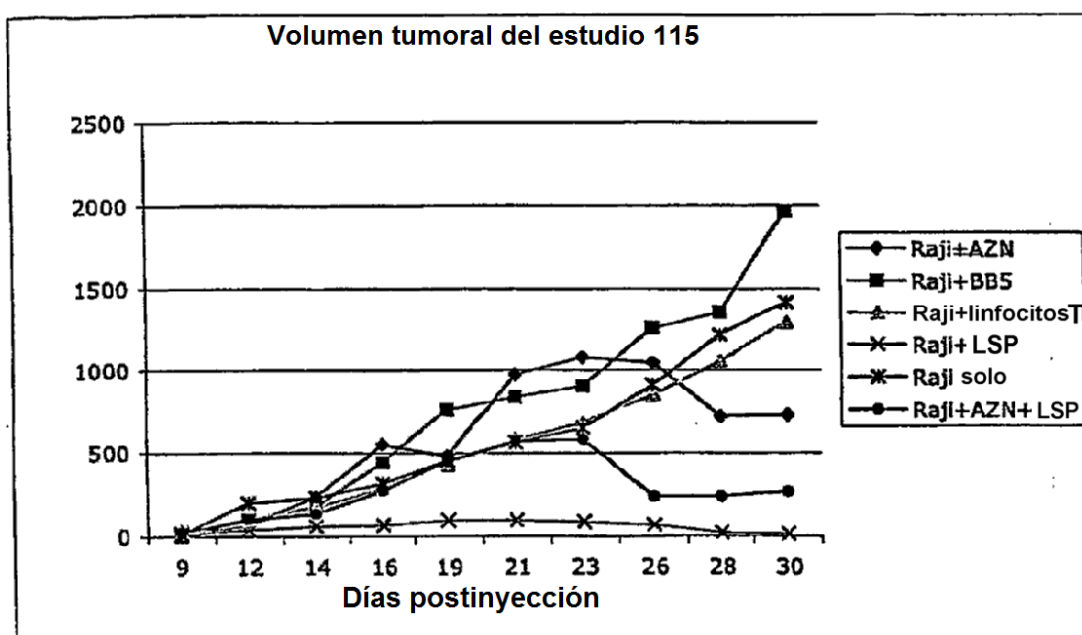


FIG. 32

FIGURA 33

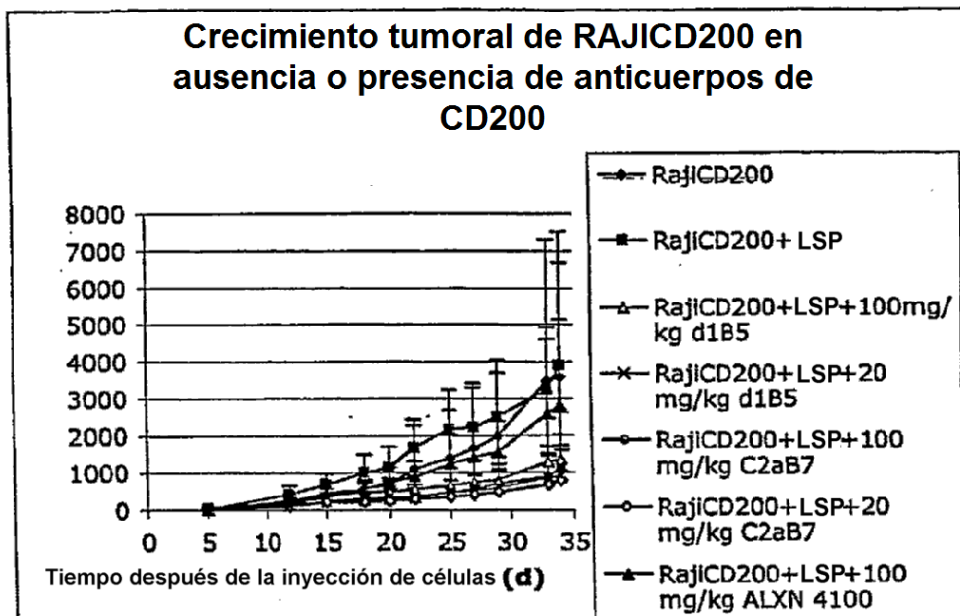


FIGURA 34

