

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 642**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2010 E 10798340 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2516468**

54 Título: **Anticuerpos anti-FLT3 y métodos de usar los mismos**

30 Prioridad:

23.12.2009 US 289529 P

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

09.06.2016

73 Titular/es:

**SYNIMMUNE GMBH (100.0%)
Auf der Morgenstelle 15
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**GROSSE-HOVEST, LUDGER;
BÜHRING, HANS-JÖRG;
HOFMANN, MARTIN;
AULWURM, STEFFEN y
JUNG, GRUNDRAM**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 573 642 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-FLT3 y métodos de usar los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención está en el campo de los anticuerpos y se refiere a anticuerpos específicos de FLT3 con una región Fc modificada para generar o aumentar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) así como métodos de usar tales anticuerpos como se define en las reivindicaciones.

10

Antecedentes de la invención

Se divulgan anticuerpos contra varias dianas en el estado de la técnica. En el documento EP 2011870, se han divulgado anticuerpos con Fc modificada que tienen ADCC mejorada que se han mutado en la posición 295. Además, se han divulgado anticuerpos individuales que se dirigen a CD20 (documento US2005/0054832), factores tisulares (documento WO2008/137382) o CD19/CD20 (documento US2008/0260731) que tienen una mutación S239D/I332E y unión de Fc o ADCC mejoradas.

15

20

25

El receptor tirosina quinasa FLT3 expresado en la superficie celular de células progenitoras hematopoyéticas desempeña un papel importante en hematopoyesis temprana. Debido a su papel esencial en regular supervivencia, proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas (células B y T), la actividad anormal de FLT3 está implicada en el desarrollo y evolución de cánceres del sistema hematopoyético. Por ejemplo, las duplicaciones internas en tándem de FLT3 son las mutaciones más comunes asociadas con leucemia mielógena aguda (LMA). Por tanto, hay una necesidad en la técnica para anticuerpos que pueden específicamente dirigirse y destruir células que expresan FLT3.

Por tanto, un objeto de los inventores de la presente invención era proporcionar anticuerpos anti-FLT3 que se pueden unir a y destruir células que expresan FLT3 *in vivo*.

30 Compendio de la invención

La presente invención se dirige a anticuerpos IgG dirigidos contra el receptor tirosina quinasa FLT3 humano y métodos de usar los mismos. En ciertos aspectos, los anticuerpos incluyen una región Fc variante. En formas de realización adicionales, los anticuerpos son anticuerpos quiméricos o humanizados. La presente invención se dirige además a composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos y métodos de usar los anticuerpos en varias indicaciones de enfermedad.

35

40

En un primer aspecto, la presente invención se dirige a un anticuerpo IgG que se une al receptor tirosina quinasa FLT3 humano, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera y tiene una sustitución de aminoácido en la región constante relativa al anticuerpo anti-FLT3 progenitor, en donde la sustitución de aminoácido incluye las sustituciones de aminoácidos S239D e I332E, en donde la numeración posicional es según el índice EU (Kabat et al., 1983).

45

En una forma de realización de la invención, el anticuerpo anti-FLT3 tiene actividad destructora de células, tal como, por ejemplo, función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Eso significa que tras el contacto con células que expresan FLT3, el anticuerpo es capaz de facilitar la muerte celular, por ejemplo, desencadenando la activación del sistema del complemento, fagocitosis o apoptosis.

50

En una forma de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera. La cadena pesada puede comprender una región CDR1 de V_H, una CDR2 de V_H y una CDR3 de V_H y/o la cadena ligera puede comprender una región CDR1 de V_L, una CDR2 de V_L y/o una CDR3 de V_L.

55

60

En una forma de realización específica, la CDR1 de V_L comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 7; la CDR2 de V_L comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 8; la CDR3 de V_L comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 9; la CDR1 de V_H comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10; la CDR2 de V_H comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 11; la CDR3 de V_H comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 12.

65

En otra forma de realización específica, la CDR1 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; la CDR2 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2; la CDR3 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3; la

CDR1 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4; la CDR2 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5; la CDR3 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6.

5 En aún otra forma de realización específica, la CDR1 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7; la CDR2 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8; la CDR3 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9; la CDR1 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10; la CDR2 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11; la CDR3 de V_H comprende o
10 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.

En una forma de realización de la invención, la cadena pesada del anticuerpo inventado comprende un dominio V_H que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14 y la cadena ligera del anticuerpo inventado comprende un dominio V_L que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos
15 mostrada en SEQ ID NO: 13.

En otra forma de realización de la invención, la cadena pesada del anticuerpo inventado comprende un dominio V_H que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30 y la cadena ligera del anticuerpo inventado comprende un dominio V_L que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos
20 mostrada en SEQ ID NO: 29.

En otra forma de realización de la invención, el anticuerpo reivindicado es un anticuerpo quimérico y comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23.
25

En otra forma de realización de la invención, el anticuerpo reivindicado es un anticuerpo quimérico y comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 39.

30 El anticuerpo de la invención, que comprende las sustituciones de aminoácidos S239D/I332E, se une con afinidad aumentada al receptor FcγRIIIa o tiene función efectora ADCC aumentada comparado con el anticuerpo progenitor sin dicha sustitución. En relación a esto, el término "aumentada" incluye escenarios donde el anticuerpo progenitor no muestra ninguna función efectora ADCC experimentalmente verificable de modo que el anticuerpo con Fc optimizada recién generado muestra, por primera vez y en contraste al anticuerpo progenitor del que puede derivar,
35 función efectora ADCC.

En otro aspecto, la presente invención presenta moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo de la invención. Estas moléculas de ácido nucleico pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena ligera, tal como se muestra en SEQ ID: 17 o
40 SEQ ID NO: 33, o una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena pesada, tal como la mostrada en SEQ ID: 18 o SEQ ID: 34.

En una forma de realización específica, el ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo de la invención tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24 y 40.
45

En otra forma de realización específica, el ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo de la invención tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28 y 44.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un anticuerpo de la invención para uso en un método de tratar linfoma o leucemia, en donde dicho método incluye administrar el anticuerpo de la invención a un sujeto en necesidad de ello. El sujeto puede ser, por ejemplo, un animal o ser humano, preferiblemente un mamífero, tal como un ser humano.
50

El linfoma o leucemia se puede seleccionar del grupo que consiste en: linfomas no hodgkinianos (LNH), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células B (B-LLA), linfoma de células del manto (LCM), leucemia de células pilosas (LCP), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda, y mieloma múltiple (MM). En una forma de realización preferida, el linfoma es leucemia mieloide aguda (LMA).
55

En otra forma de realización, la enfermedad o trastorno es síndrome mielodisplásico (SMD).
60

En varias formas de realización, el linfoma o leucemia está en el estadio de enfermedad residual mínima (ERM), por ejemplo, alcanzado después de quimioterapia convencional con o sin trasplante de células madre.

En ciertas formas de realización del anticuerpo de la invención para uso en los métodos inventados, el anticuerpo se puede administrar en combinación con al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una citoquina, un agente inhibidor de crecimiento, un agente anti-hormonal,
65

un inhibidor de quinasas, un agente antiangiogénico, un cardioprotector, un agente inmunoestimulador, un agente inmunosupresor, un inhibidor de angiogénesis, un inhibidor de proteína tirosina quinasa, y un segundo anticuerpo.

5 En un aspecto aún adicional, la presente invención también abarca una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable.

10 También se divulga en el presente documento un anticuerpo de la invención para uso en un método de inhibir la proliferación de una célula que expresa FLT3, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha célula con un anticuerpo según la invención. El método puede ser un método *in vitro*.

15 Se divulga además en el presente documento un anticuerpo de la invención para uso en un método de aumentar la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo hacia una célula que expresa FLT3, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha célula con un anticuerpo según la invención.

20 Aún más, en el presente documento se divulga un anticuerpo de la invención para uso en un método de eliminar de un mamífero al menos una célula que expresa FLT3, en donde dicho método comprende administrar al mamífero un anticuerpo según la invención.

25 Se divulga además en el presente documento un anticuerpo de la invención para uso en un método para dirigirse a una célula que expresa FLT3. El direccionamiento puede incluir el uso del anticuerpo para administrar un fármaco o una toxina a la célula que expresa FLT3.

30 En un aspecto aún adicional, la divulgación abarca el uso de un anticuerpo según la invención para la detección de una célula que expresa FLT3 en una muestra biológica. Para tal uso, el anticuerpo se puede marcar con una fracción detectable, tal como un fluoróforo, cromóforo, etiqueta inmunogénica y similares.

35 La presente invención también se dirige a un anticuerpo monoclonal como se describe en el presente documento contra FLT3, en donde el anticuerpo se produce por una línea celular productora transfectada, tal como CHO o Sp2/0.

40 En un aspecto aún adicional, la invención presenta una línea celular transfectada que produce un anticuerpo según la invención.

45 Breve descripción de las figuras

50 La invención se entenderá mejor con referencia a la descripción detallada cuando se considera junto con los ejemplos no limitantes y las figuras acompañantes.

55 La figura 1 muestra una representación esquemática del procedimiento de clonación para la quimerización de anticuerpos monoclonales. Las cajas representan exones, el círculo indica elementos del potenciador y la línea fina regiones UT y secuencias de intrones. P, promotor, L₁ y L₂, secuencias líder codificadas por dos exones diferentes; E, potenciador; V, región variable; D, región de diversidad; J, región de unión; C₍₁₋₃₎ exones de la región constante; H, región bisagra.

60 La figura 2 muestra el vector parental que contiene la región VJ de la cadena ligera de ratón y la región C del gen κ humano. La región relevante para el intercambio de fragmentos se muestra agrandada en la figura 2A. El contexto de secuencia generado tras la inserción de la región VJ de anticuerpos monoclonales BV10 o 4G8 en el vector de expresión chimFLT3-light se muestra en la figura 2B. El sitio de corte para péptidos señal secretores se indica por |; y los límites exón-intrón por [,].

65 La figura 3 muestra el vector original que contiene la cadena pesada de Ig isotipo γ1 humana. la región relevante para clonar el fragmento VDJ se muestra agrandado (a). El fragmento MluI-SpeI que se va a intercambiar (mostrado agrandado como b) contiene la región constante entera de la cadena pesada γ1 humana y dos modificaciones de aminoácidos en el dominio CH2 como se indica (Ser₂₃₉-Asp; Iso₃₃₂-Glu). La figura 3B muestra el contexto de secuencia generado tras la inserción de la región VDJ de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales BV10 o 4G8 en el vector de expresión de la cadena ligera chimFLT3-heavy. El sitio de corte para péptidos señal secretores se indica por |; y los límites exón-intrón por [,].

La figura 4 muestra los efectos destructores de células de los anticuerpos quiméricos con Fc optimizada chim4G8-SDIE (A) y chimBV10-SDIE (B) respectivamente, y CMSP humanas sin estimular contra célula de leucemia NALM16 humanas que expresan FLT3 en comparación con los anticuerpos quiméricos sin modificar chim4G8 y chimBV10. La figura 4 C muestra los efectos destructores de células de anticuerpos quiméricos dirigidos a NG2 que se han optimizado para Fc en las mismas posiciones que los anticuerpos anteriores chim4G8-SDIE y chimBV10-SDIE en células de melanoma SKMel63 humanas. La citotoxicidad se determinó usando un ensayo de liberación de cromo, se indican la duración del ensayo y las proporciones diana:efector.

ES 2 573 642 T3

La figura 5 muestra el efecto destructor de células por el anticuerpo anti-FLT3 optimizado 4G8-SDIE y CMSP humanas sin estimular en blastocitos de LMA en comparación con el anticuerpo de ratón parental sin modificar.

5 La figura 6 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera (A) y pesada (B) de los clones 4G8 y BV10 del anticuerpo anti-FLT3.

10 La figura 7 muestra la unión de 4G8 y BV10 de ratón, quiméricos y optimizados a FLT3. Células Sp2/0 (A) o células NALM16 (B, C) transfectadas con FLT3 y con vector vacío se incubaron con los anticuerpos indicados y se analizaron por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. Los histogramas blancos y sombreados en (A) representan tinción con control de isotipo y los anticuerpos de FLT3 indicados (10 µg/ml), respectivamente. IFM = Intensidad de fluorescencia media.

15 La figura 8 muestra el efecto de 4G8SDIEM sobre unión de ligando de FLT3 (FLT3L) y proliferación de células leucémicas. (A) Se incubaron células NALM16 con 4G8SDIEM o BV10SDIEM a 1 µg/ml en presencia de las concentraciones indicadas de ligando de FLT3 recombinante y la cantidad de anticuerpo unido se determinó por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. (B) Blastocitos de LMA aislados de la sangre periférica de tres pacientes diferentes por centrifugación en gradiente de densidad se incubaron con las concentraciones indicadas de 4G8SDIEM durante 24 horas y se evaluó la proliferación usando un ensayo de absorción de ^3H -timidina. Las barras a la derecha representan proliferación en ausencia del anticuerpo.

20 La figura 9 muestra la actividad ADCC de versiones sin modificar y modificadas con SDIEM de los anticuerpos contra FLT3 4G8 y BV10. Se incubaron células NALM16 marcadas con ^{51}Cr durante 4 horas con CMSP de un donante sano (#4) en presencia de las concentraciones indicadas de las versiones quiméricas sin modificar (X) o modificada con SDIEM de 4G8 y BV10 a una proporción de CMSP:células diana de 50:1. La destrucción de las células diana se determinó usando un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar. Se representa un resultado representativo de 6 experimentos independientes con CMSP de distintos donantes sanos.

25 La figura 10 muestra la actividad ADCC de 4G8SDIEM contra células leucémicas. La actividad citolítica de las CMSP de tres donantes sanos diferentes (CMSP #1, #2, #3) contra células NALM16 (A) y de las CMSP del donante #2 contra blastocitos leucémicos de tres pacientes diferentes (LMA #1, #2, #7) (B) se determinó en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de 4 horas y 8 horas, respectivamente. En (C) se representa la actividad citolítica después de 8 horas contra blastocitos de LMA #1 y #15 usando CMSP autólogas de los respectivos pacientes como células efectoras. Los símbolos negros y vacíos blancos ADCC mediada por 4G8SDIEM y anticuerpo control sin unión 9.2.27SDIE, respectivamente. Las barras negras a la derecha (NK) indican actividad NK en ausencia del anticuerpo. Nótese que CMSP #1-3 se refiere a las CMSP de donantes sanos y no están relacionados a los blastocitos de LMA #1-3.

30 La figura 11 muestra un desplazamiento antigénico y expresión de FLT3 en células leucémicas de diferente origen. (A) Células NALM16 y blastocitos de dos pacientes de LMA diferentes se incubaron con las concentraciones indicadas de 4G8SDIEM. Después de 48 horas las células se lavaron, se volvieron a incubar con 2 µg/ml de 4G8SDIEM y se analizaron por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. La expresión de FLT3 detectada en las células preincubadas sin anticuerpos se definió como el 100%. (B) Se incubaron blastocitos de LMA de 15 pacientes con 4G8 de ratón (10 µg/ml), se lavaron y analizaron por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. La cantidad de moléculas de anticuerpo unidas se determinó por comparación con bolas calibradas (QIFIKIT). (C) Los blastocitos de LMA usados en (B) se incubaron con 4G8SDIEM conjugado a PE o anticuerpo 9.2.27SDIE conjugado a PE sin unión (10 µg/ml) y se analizaron por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. IFE = Índice de fluorescencia específico. El IFE de cuatro muestras no se determinó (n.d.) debido a la alta unión del anticuerpo control 9.2.27SDIE.

35 40 45 50 La figura 12 muestra la expresión de FLT3 en CD normales y células de médula ósea. (A) CD aisladas de la sangre periférica de donantes sanos por separación celular magnética se incubaron con 4G8 de ratón, se lavaron, tiñeron con un anticuerpo secundario marcado, se lavaron de nuevo, y se incubaron con una mezcla de anticuerpos contra CD11c y CD303 diferentemente marcados. Las células se analizaron después por citometría de flujo. La unión de 4G8 a la subpoblación CD303+ pCD y CD11c+ mCD se representa en (B) y (C), respectivamente. (D, E) similar a (A-C) células de médula ósea normales aisladas por centrifugación en gradiente de densidad se incubaron con 4G8 de ratón, se lavaron, tiñeron con anticuerpo secundario marcado y una mezcla de anticuerpo contra CD34 y CD45 diferentemente marcados. La unión de 4G8 a la subpoblación CD34+CD45low se representa en (E). Los histogramas sombreados representan tinción primaria con control de isotipo, los histogramas blancos con 4G8 de ratón. Se muestran resultados representativos de uno de tres experimentos con CD y células de médula ósea de diferentes donantes sanos.

55 60 65 La figura 13 muestra la actividad citotóxica de 4G8SDIEM contra células normales. (A) Se incubaron células de médula ósea humana de dos donantes diferentes (barras negras y sombreadas) con 5 µg/ml de 4G8 SDIEM y se determinaron las unidades formadoras de colonias después de 12 días de incubación en medio semisólido. Los números de UFC se relacionaron a los controles sin tratar. (B) Se usaron CD aisladas de las CMSP de donantes sanos por separación celular magnética y células NALM16 como dianas para 4G8SDIEM en un ensayo de liberación

de 51[Cr] de 4 horas (proporción CMSP:diana 100:1). Se muestra un experimento representativo de tres con CD y CMSP autólogas de diferentes donantes.

La figura 14 muestra los efectos *in vitro* del anticuerpo 4G8 en células diana y efectoras de un paciente. (A) Se analizaron las CMSP del paciente por FACS para expresión de FLT3 usando el anticuerpo 4G8 de ratón parental y control de isotipo seguido por conjugado anti-ratón-PE y doble tinción para CD34. (B, C). Se incubaron CMSP del paciente con células NALM16 positivas para FLT3 marcadas con cromo (B) o blastocitos del paciente aislados por selección CD34+ (C). Se pretrataron células diana con las concentraciones indicadas de 4G8-SDIEM o el anticuerpo 4G8 quimérico sin modificar (4G8-ch). Se determinó la inducción de ADCC por ensayos de liberación de cromo a una proporción CMSP:diana de 50:1. Nótese que se utilizaron CMSP y células NK no purificadas.

La figura 15 muestra la semivida y características de unión de 4G8-SDIEM *in vivo*. (A) La semivida en suero de 4G8-SDIEM se determinó incubando células NALM16 que expresan FLT3 con las muestras de suero obtenidas a diferentes puntos temporales de aplicación clínica. La cantidad de anticuerpo específicamente unido se determinó por FACS y se comparó a la actividad de unión de muestras de suero que contenían niveles definidos de 4G8-SDIEM. ND, no determinado. (B) Para detectar la unión a 4G8-SDIEM *in vivo*, blastocitos de MO obtenidos antes de la terapia (d0) y 1 h después de la aplicación de la dosis de 10 mg (d5) se incubaron con el anticuerpo de ratón 4G8 parental, un segundo anticuerpo anti-FLT3 de ratón sin reactividad cruzada (BV10) como se indica, o control de isotipo (picos blancos) a 10 µg/ml, seguido por un conjugado anti-ratón-PE absorbido humano. La inhibición completa de la unión a 4G8 de ratón, pero no de BV10 determinada por FACS indica unión saturante de 4G8-SDIEM.

La figura 16 muestra los efectos clínicos de 4G8-SDIEM. (A, B) Los porcentajes de blastocitos CD34+ (círculos blancos) y células NK (CD69+) CD56+CD3- activadas (rombos) entre las células mononucleares en sangre periférica (SP) (A) o médula ósea (MO) (B) se determinaron por FACS en los tiempos indicados durante el tratamiento de leucemia manifiesta. (C) Se determinaron los niveles en suero de TNF a los tiempos indicados durante el tratamiento de leucemia manifiesta por medida con IMMULITE®. (D) Se determinaron el porcentaje de células NK activadas entre células mononucleares en SP (rombos) y niveles en suero de TNF (círculos) como se ha descrito anteriormente en los tiempos indicados durante la aplicación de 4G8-SDIEM en remisión completa (RC).

Descripción detallada de la invención

Los términos usados en el presente documento, a menos que se indique explícitamente otra cosa, tienen los siguientes significados.

Mediante "ADCC" o "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" como se usa en el presente documento se quiere decir la reacción mediada por células en donde células citotóxicas que expresan FcγRs reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana.

Mediante "ADCP" o "fagocitosis celular dependiente por anticuerpo" como se usa en el presente documento se quiere decir la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la fagocitosis de la célula diana.

Mediante "aminoácido" e "identidad de aminoácido" como se usa en el presente documento se quiere decir uno de los 20 aminoácidos naturales o cualquier análogo no natural que puede estar presente en una posición específica, definida. Por tanto, "aminoácido" como se usa en el presente documento es tanto aminoácidos naturales como sintéticos. Por ejemplo, homofenilalanina, citrulina y norleucina se consideran aminoácidos para los fines de la invención. "Aminoácido" también incluye residuos de iminoácido tal como prolina e hidroxiprolina. La cadena lateral puede estar en la configuración (R) o (S). En una forma de realización, los aminoácidos están en la configuración (S) o L. Si se usan cadenas laterales no naturales, se pueden usar sustituyentes no aminoácidos, por ejemplo, para prevenir o retrasar la degradación *in vivo*.

Mediante "anticuerpo" en el presente documento se quiere decir una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por todo o parte de genes de inmunoglobulinas reconocidos. Los genes de inmunoglobulinas reconocidos, por ejemplo, en seres humanos, incluyen los loci genéticos kappa (κ), lambda (λ), y de cadena pesada, que juntos comprenden los innumerables genes de la región variable, y los genes de la región constante mu (μ), delta (δ), gamma (γ), epsilon (ε) y alfa (α) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgE e IgA (IgA1 e IgA2), respectivamente. Anticuerpo en el presente documento se pretende que incluya anticuerpo de longitud completa y fragmentos de anticuerpos, y se puede referir a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo manipulado, o un anticuerpo generado recombinantemente para fines experimentales, terapéuticos u otros.

Mediante "célula B" o "linfocito B" como se usa en el presente documento se quiere decir un tipo de linfocito desarrollado en médula ósea que circula en la sangre y la linfa, y proporciona inmunidad humoral. Las células B reconocen moléculas de antígeno libre y se diferencian o maduran a células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas (anticuerpos) que inactivan los antígenos. También se generan células memoria que producen la

inmunoglobulina (anticuerpo) específica en posteriores encuentros con tal antígeno. Las células B también se conocen como “células beta” en los islotes de Langerhans.

5 Mediante “célula T” o “linfocito T” como se usa en el presente documento se quiere decir un tipo de linfocito desarrollado en la médula ósea que circula en la sangre y la linfa, y proporciona inmunidad celular. Las células T comprenden un receptor de células T que reconoce moléculas de antígeno unidas a células. Las células T pueden madurar a células T cooperadoras que secretan citoquinas y activan otros tipos de células o células T citotóxicas que se unen a y destruyen otras células.

10 Mediante “FLT3” (receptor tirosina quinasa similar a fms 3), “FLK2” (quinasa de hígado fetal 2), y “CD135” como se usan de forma intercambiable en el presente documento se quiere decir un receptor de citoquinas expresado en la superficie de células progenitores hematopoyéticas. FLT3 es un marcador de superficie celular usado para identificar ciertos tipos de progenitores hematopoyéticos (de sangre) en la médula ósea. Específicamente, progenitores multipotentes (PMP) y progenitores linfoides comunes (PLC) expresan altos niveles en superficie de FLT3. El receptor FLT3 se une a la citoquina ligando de Flt3 (Flt3L). FLT3 es un receptor tirosina quinasa de tipo III. Cuando este receptor se une a Flt3L forma un dímero (homodímero) que activa la señalización de segundos mensajeros. La señalización de FLT3 desempeña un papel importante en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular de desarrollo de linfocitos (célula B y célula T). Como la desregulación de la señalización de FLT3 puede producir enfermedades proliferativas, tal como cáncer, y en particular leucemia, FLT3 se clasifica como un protooncogén. De hecho, las duplicaciones en tándem internas de FLT3 son las mutaciones más comunes asociadas con leucemia mielógena aguda (LMA). El uso de FLT3 en el presente documento se pretende que abarque todos los alelos y formas polimórficas de FLT3 conocidos o aún sin descubrir. La secuencia del antígeno FLT3 humano se proporciona en SEQ ID NO: 65.

25 Mediante “CDC” o “citotoxicidad dependiente del complemento” como se usa en el presente documento se quiere decir la reacción en donde uno o más componentes proteicos del complemento reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana.

30 Mediante “región constante” de un anticuerpo como se define en el presente documento se quiere decir la región del anticuerpo que está codificada por uno de los genes de la región constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina.

35 Mediante “cadena ligera constante” o “región constante de la cadena ligera” como se usa en el presente documento se quiere decir la región de un anticuerpo codificada por las cadenas ligeras kappa (C_{κ}) o lambda (C_{λ}). La cadena ligera constante típicamente comprende un dominio único, y como se define en el presente documento se refiere a las posiciones 108-214 de C_{κ} o lambda C_{λ} , en donde la numeración es según el índice EU.

40 Mediante “cadena pesada constante” o “región constante de la cadena pesada” como se usa en el presente documento se quiere decir la región de un anticuerpo codificada por los genes mu, delta, gamma, alfa o épsilon para definir el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA o IgE, respectivamente. Para anticuerpos IgG de longitud completa, la cadena pesada constante, como se define en el presente documento, se refiere al extremo N del dominio CH1 hasta el extremo C del dominio CH3, que por tanto comprende las posiciones 118-447, en donde la numeración es según el índice EU.

45 Mediante “función efectora” como se usa en el presente documento se quiere decir un suceso bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por Fc γ R tal como ADCC o ADCP, y funciones efectoras mediadas por complemento tal como CDC.

50 Mediante “célula efectora” como se usa en el presente documento se quiere decir una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero no están limitadas a monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, células cebadas, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células citolíticas naturales (NK), y células T y pueden ser de cualquier organismo incluyendo, pero no limitado a seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

60 Mediante “Fab” o “región Fab” como se usa en el presente documento se quiere decir los polipéptidos que comprenden los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VH, y CL. Fab se puede referir a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo.

65 Mediante “Fc” o “región Fc”, como se usa en el presente documento se quiere decir el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Por tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD e IgG, y a los últimos tres dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgE e IgM, y a la bisagra flexible N-terminal a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina $C_{\gamma 2}$ y $C_{\gamma 3}$ y la bisagra entre $C_{\gamma 1}$ y $C_{\gamma 2}$. Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc

de la cadena pesada de IgG humana habitualmente se define que comprende desde los residuos C226 o P330 hasta su extremo carboxilo, en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat. Fc se puede referir a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un polipéptido Fc, por ejemplo, un anticuerpo.

5 Mediante “polipéptido Fc” como se usa en el presente documento se quiere decir un polipéptido que comprende todo o parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen fusiones de Fc de anticuerpos, Fc aisladas y fragmentos Fc.

10 Mediante “receptor gamma de Fc” o “FcγR” como se usa en el presente documento se quiere decir cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc del anticuerpo IgG y están sustancialmente codificadas por los genes FcγR. En seres humanos esta familia incluye, pero no está limitada a FcγRI (CD64), que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluye las isoformas FcγRIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluye las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65), así como cualquier FcγR humano o isoformas o alotipos de FcγR no descubiertos. Los FcγR de ratón incluyen, pero no están limitados a, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier FcγR de ratón o isoformas o alotipos de FcγR no descubiertos. Un FcγR puede ser de cualquier organismo incluyendo, pero no limitado a seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos.

20 Mediante “ligando de Fc” o “receptor de Fc” como se usa en el presente documento se quiere decir una molécula, por ejemplo, un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo Fc-ligando. Los ligandos de Fc incluyen, pero no están limitados a FcγR, FcRn, C1q, C3, lectina que se une a manano, receptor de manosa, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica, y FcγR vírico. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor de Fc (FcRH), que son una familia de receptores de Fc que son homólogos a los FcγR (Davis et al., 2002, *Immunological Reviews* 190:123-136). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc.

30 Mediante “IgG” como se usa en el presente documento se quiere decir un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen gamma de inmunoglobulina reconocido. En seres humanos esta clase comprende IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones esta clase comprende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

35 Mediante “inmunoglobulina (Ig)” en el presente documento se quiere decir una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas incluyen, pero no están limitadas a anticuerpos. Las inmunoglobulinas pueden tener un número de formas estructurales incluyendo, pero no limitado a anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, y dominios de inmunoglobulinas individuales.

40 Mediante “dominio de inmunoglobulina (Ig)” en el presente documento se quiere decir una región de una inmunoglobulina que existe como una entidad estructural distinta determinado por un experto en la materia de la estructura de proteínas. Los dominios Ig típicamente tienen una topología de plegamiento en sándwich β característico. Los dominios Ig conocidos en la clase IgG de anticuerpos son VH, Cy1, Cy2, Cy3, VL y CL.

45 Mediante “modificación de aminoácido” en el presente documento se quiere decir una sustitución, inserción y/o delección de aminoácido en una secuencia polipeptídica.

50 Mediante “sustitución de aminoácido” o “sustitución” en el presente documento se quiere decir el cambio de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica progenitora con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución I332F se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de la cadena pesada constante, en la que la isoleucina en la posición 332 se sustituye con ácido glutámico. El residuo de tipo salvaje se puede designar o no. Para el ejemplo precedente, 332E indica la sustitución de la posición 332 con un ácido glutámico. Para los fines en el presente documento, múltiples sustituciones están típicamente separadas por una barra oblicua. Por ejemplo, 239D/332E se refiere a una variante doble que comprende las sustituciones 229D y 332E.

55 Mediante “inserción de aminoácido” o “inserción” en el presente documento se quiere decir la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica progenitora. Por ejemplo, inserto -236G designa una inserción de glicina en la posición 236.

60 Mediante “delección de aminoácido” o “delección” en el presente documento se quiere decir la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica progenitora. Por ejemplo, G236- designa la delección de glicina en la posición 236.

65 Mediante “polipéptido progenitor”, “proteína progenitora”, “polipéptido precursor” o “proteína precursora” como se usan de forma intercambiable en el presente documento se quiere decir un polipéptido que se modifica posteriormente para generar una variante, por ejemplo, cualquier polipéptido que sirva como molde y/o base para al menos una modificación de aminoácido descrita en el presente documento. El polipéptido progenitor puede ser un

polipéptido natural, o una variante o versión manipulada de un polipéptido natural. El polipéptido progenitor se puede referir al polipéptido mismo, composiciones que comprenden el polipéptido progenitor, o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Según esto, mediante "anticuerpo progenitor" o "inmunoglobulina progenitora" como se usa en el presente documento se quiere decir un anticuerpo o inmunoglobulina que se modifica para generar una variante (por ejemplo, un anticuerpo progenitor puede incluir, pero no está limitado a, una proteína que comprende la región constante de una Ig natural).

Mediante "proteína" o "polipéptido" como se usa en el presente documento se quiere decir al menos dos aminoácidos covalentemente unidos, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. La proteína puede estar hecha de aminoácidos naturales y enlaces peptídicos, o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir, "análogos", tal como peptoides.

Mediante "posición" como se usa en el presente documento se quiere decir una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones se pueden numerar secuencialmente, o según un formato establecido, por ejemplo, el índice EU como en Kabat (Kabat et al., 1983). Si no se indica otra cosa, todas las posiciones mencionadas en el presente documento se numeran según el índice EU. las posiciones correspondientes se determinan como se esboza en el presente documento, generalmente mediante alineamiento con otras secuencias progenitoras.

Mediante "residuo" como se usa en el presente documento se quiere decir una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, serina 239 (también denominada Ser239 y S239) es un residuo en la posición 239 en el anticuerpo IgG1 humano.

Mediante "antígeno diana" o "diana" o "antígeno" como se usa en el presente documento se quiere decir la molécula que se une específicamente a la región variable de un anticuerpo determinado. Un antígeno diana puede ser una proteína, hidrato de carbono, lípido u otro compuesto químico.

Mediante "célula diana" como se usa en el presente documento se quiere decir una célula que expresa un antígeno diana.

Mediante "región variable" como se usa en el presente documento se quiere decir la región de una inmunoglobulina que comprenden uno o más dominios Ig sustancialmente codificados por cualquiera de los genes V κ , V λ y/o V H que componen los loci genéticos de inmunoglobulinas kappa, lambda y cadena pesada.

Mediante "proteína variante", "variante de proteína", "polipéptido variante" o "variante de polipéptido" como se usan en el presente documento se quiere decir una secuencia polipeptídica que se diferencia de la de una secuencia polipeptídica progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Polipéptido variante se puede referir al polipéptido mismo, una composición que comprende el polipéptido, o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. En una forma de realización, el polipéptido variante tiene al menos una modificación de aminoácido comparado con el polipéptido progenitor, por ejemplo, desde aproximadamente una hasta aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, desde aproximadamente una hasta aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos comparado con el progenitor. La secuencia polipeptídica variante en el presente documento posee al menos aproximadamente el 80% de homología con una secuencia polipeptídica progenitora, por ejemplo, al menos aproximadamente el 90% de homología, al menos aproximadamente el 95% de homología, etc. Según esto, mediante "anticuerpo variante" o "variante de anticuerpo" como se usa en el presente documento se quiere decir una secuencia de anticuerpo que se diferencia en la de una secuencia de anticuerpo progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Anticuerpo variante o variante de anticuerpo se puede referir al polipéptido anticuerpo mismo, composiciones que comprenden el polipéptido variante de anticuerpo, o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Según esto, mediante "variante de cadena pesada constante" o "variante de cadena ligera constante" o "variante de Fc" como se usa en el presente documento se quiere decir un polipéptido o secuencia de cadena pesada constante, una cadena ligera constante o región Fc, respectivamente, que se diferencia en secuencia de la de una secuencia progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido.

Mediante "tipo salvaje" o "WT" en el presente documento se quiere decir una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG, etc., WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionalmente.

Para todas las posiciones de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina discutidas en la presente invención, la numeración es según el índice EU como en Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos en el anticuerpo IgG1 EU humano, como se describe en Edelman et al., 1969, Biochemistry 63 78-85).

"Antígenos" son macromoléculas capaces de generar una respuesta de anticuerpos en un animal y ser reconocidos por el anticuerpo resultante. Tanto antígenos como haptenos comprenden al menos un determinante antigénico o

“epítopo”, que es la región del antígeno o hapteno que se une al anticuerpo. Típicamente, el epítopo en un hapteno es la molécula entera.

El término “muestra”, como se usa en el presente documento, se refiere a una alícuota de material, frecuentemente matrices biológicas, una solución acuosa o una suspensión acuosa derivada de material biológico. Las muestras que se van a ensayar para la presencia de un analito por los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, células, tejidos, homogenados, lisados, extractos, y proteínas purificadas o parcialmente purificadas y otras moléculas biológicas y mezclas de las mismas.

Los ejemplos no limitantes de muestras típicamente usadas en los métodos de la invención incluyen líquidos corporales humanos y animales tal como sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado bronquial, aspirados bronquiales, orina, semen, líquidos de linfa y varias secreciones externas de los aparatos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, glóbulos blancos, mielomas y similares; líquidos biológicos tal como sobrenadantes de cultivos celulares; muestras de tejidos que puede o no estar fijadas; y muestras celulares que pueden o no estar fijadas. Las muestras usadas en los métodos de la presente invención variarán basado en el formato de ensayo y la naturaleza de los tejidos, células, extractos u otros materiales, especialmente materiales biológicos, que se van a ensayar. Los métodos para preparar extractos de proteínas de células o muestras se conocen bien en la técnica y se pueden adaptar fácilmente para obtener una muestra que sea compatible con los métodos de la invención.

“Se une específicamente” y “unión específica”, como se usan en el presente documento, significan que un anticuerpo se une a su (analito) diana basado en el reconocimiento de un epítopo en la molécula diana. El anticuerpo preferiblemente reconoce y se une a la molécula diana con una afinidad de unión mayor con la que se une a otros compuestos que pueden estar presentes. En varias formas de realización de la invención, “se une específicamente” puede significar que un anticuerpo se une a una molécula diana con al menos aproximadamente una afinidad 10^6 veces mayor, preferiblemente al menos aproximadamente una afinidad 10^7 veces mayor, más preferiblemente al menos aproximadamente una afinidad 10^8 veces mayor, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente una afinidad 10^9 veces mayor de lo que se une a moléculas no relacionadas a la molécula diana. Típicamente, unión específica se refiere a afinidades en el intervalo desde aproximadamente 10^6 veces hasta aproximadamente 10^9 veces mayores que la unión no específica. En algunas formas de realización, la unión específica puede estar caracterizada por afinidades mayores de 10^9 veces sobre la unión no específica. La afinidad de unión se puede determinar por cualquier método adecuado. Tales métodos se conocen en la técnica e incluyen, sin limitación, resonancia de plasmón de superficie y calorimetría de titulación isotérmica. En una forma de realización específica, el anticuerpo únicamente reconoce y se une al analito diana.

El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto para posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, están dirigidos contra un sitio antigénico único. Además, en contraste a preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar por cultivo de hibridoma, sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción de un anticuerpo por cualquier método particular. Los anticuerpos monoclonales pueden incluir anticuerpos “quiméricos” (patente en EE UU No. 4.816.567; y Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855) y anticuerpos humanizados (Jones et al. (1986) Nature, 321: 522-525; Reichmann et al. (1988) Nature, 332: 323-329; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596).

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no están limitadas a la técnica del hibridoma de Koehler y Milstein (1975), Nature, 256: 495-7; y patente en EE UU No. 4.376.110), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor, et al. (1983), Immunology Today, 4: 72; Cote, et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026-30), y la técnica del hibridoma de EBV (Cole, et al. (1985), en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., Nueva York, pp. 77-96). La preparación de anticuerpos monoclonales específicos para un compuesto diana también se describe en Harlow y Lane, eds. (1988) Antibodies - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Capítulo 6. Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el Acm se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. La producción de títulos altos de Acm *in vivo* hace este un método muy eficaz de producción.

Los “anticuerpos policlonales” son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas del suero de animales inmunizados con un antígeno, o un derivado funcional antigénico del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales, animales huéspedes tal como conejos, ratones y cabras, se pueden inmunizar por inyección con un antígeno o conjugado hapteno-portador opcionalmente suplementado con adyuvantes.

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente en EE UU No. 4.946.778; Bird (1988), *Science* 242: 423-26; Huston, et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-83; y Ward, et al. (1989), *Nature*, 334: 544-46) se pueden adaptar para producir anticuerpo monocatenarios génicos. Los anticuerpos monocatenarios típicamente se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, lo que produce un polipéptido monocatenario.

Se pueden generar fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no están limitados a: los fragmentos F(ab')₂ que se pueden producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab (Huse, et al., (1989), *Science*, 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

Los términos "polinucleótido" y "(molécula de) ácido nucleico" se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, incluyendo ácidos nucleicos naturales y no naturales. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Los métodos para la selección y preparación de ácidos nucleicos son diversos y están bien descritos en protocolos biomoleculares estándar. Una manera típica sería PCR preparativa y purificación cromatográfica empezando de ADN moldes existentes o síntesis por pasos de ácidos nucleicos artificiales. Típicamente, las moléculas de ácido nucleico a que se hace referencia en el presente documento son moléculas de ADN.

El término "al menos uno" como se usa en el presente documento en relación con sustituciones de aminoácidos se refiere a al menos 1, pero preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o una pluralidad de sustituciones de aminoácidos.

Los términos "poner en contacto" o "incubar", como se usan de forma intercambiable en el presente documento, se refiere generalmente a proporcionar acceso de un componente, reactivo, analito o muestra al otro.

El término "detectar" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier método de verificar la presencia de una molécula determinada. Las técnicas usadas para lograr esto pueden incluir, pero no están limitadas a, inmunoensayos, tal como ELISA e inmuno PCR (IPCR).

Las neoplasias malignas hematológicas son tipos de cáncer que afectan a la sangre, médula ósea, y ganglios linfáticos. Las neoplasias malignas hematológicas pueden derivar de cualquiera de los dos principales linajes celulares de la sangre: líneas celulares mieloides y linfoides. La línea celular mieloides normalmente produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y células cebadas; la línea celular linfoides produce células B, T, NK y plasmáticas. Linfomas, leucemias linfocíticas y mieloma son a partir de la línea linfoides, mientras que leucemia mielógena aguda y crónica, síndromes mielodisplásicos y enfermedades mieloproliferativas son mieloides en origen.

La leucemia es un cáncer de la sangre o médula ósea y se caracteriza por una proliferación anormal de células sanguíneas, habitualmente glóbulos blancos (leucocitos). La leucemia se subdivide clínica y patológicamente en una variedad de grandes grupos. La leucemia aguda se caracteriza por el rápido aumento de células sanguíneas inmaduras. Esta aglomeración hace a la médula ósea incapaz de producir células sanguíneas sanas. Se requiere tratamiento inmediato en leucemia aguda debido a la rápida evolución y acumulación de células malignas, que después se desbordan al torrente sanguíneo y se expanden a otros órganos del cuerpo. Las formas agudas de leucemia son las formas más comunes de leucemia en niños. La leucemia crónica se distingue por la excesiva acumulación de glóbulos blancos relativamente maduros, pero aún anómalos. Típicamente lleva meses o años para evolucionar, las células se producen a una tasa mucho más alta que células normales, lo que produce muchos glóbulos blancos anormales en la sangre. Mientras que la leucemia aguda se debe tratar inmediatamente, las formas crónicas algunas veces se siguen durante algún tiempo antes del tratamiento para asegurar la máxima eficacia de la terapia. La leucemia crónica se produce principalmente en personas mayores, pero teóricamente se puede producir en cualquier grupo de edad. Además, las enfermedades se subdividen según qué tipo de célula sanguínea está afectada. Esta división divide las leucemias en leucemias linfoblásticas o linfocíticas y leucemias mieloides o mielógenas. En leucemias linfoblásticas o linfocíticas, el cambio canceroso tiene lugar en un tipo de célula medular que normalmente sigue para formar linfocitos, que son células del sistema inmunitario que luchan contra la infección. La mayoría de las leucemias linfocíticas implican un subtipo específico de linfocito, la célula B. En las leucemias mieloides o mielógenas, el cambio canceroso tiene lugar en un tipo de célula medular que normalmente sigue para formar glóbulos rojos, algunos otros tipos de glóbulos blancos y plaquetas.

La leucemia mieloides aguda (LMA), también conocida como leucemia mielógena aguda, es un cáncer de la línea mieloides de células sanguíneas, caracterizado por el crecimiento rápido de glóbulos blancos anormales que se acumulan en la médula ósea e interfieren con la producción de células sanguíneas normales. La LMA es la leucemia aguda más común que afecta a adultos, y su incidencia aumenta con la edad. Aunque la LMA es una enfermedad relativamente rara, que representa aproximadamente el 1,2% de muertes por cáncer en los Estados Unidos, se espera que su incidencia aumente según envejece la población.

Los síntomas de la LMA están causados por la sustitución de médula ósea normal con células leucémicas, lo que produce una caída en glóbulos rojos, plaquetas, y glóbulos blancos normales. Estos síntomas incluyen fatiga, falta de aliento, cardenales y hemorragias con facilidad, y riesgo aumentado de infección. Aunque se han identificado varios factores de riesgo para LMA, la causa específica de la enfermedad permanece poco clara. Como una leucemia aguda, la LMA evoluciona rápidamente y típicamente es letal en semanas o meses si se deja sin tratar.

La LMA tiene varios subtipos; el tratamiento y pronóstico varía entre subtipos. La supervivencia a cinco años varía del 15-70% y la tasa de recaída varía del 78-33%, dependiendo del subtipo.

Los anticuerpos monoclonales son una clase de proteínas terapéuticas que se pueden usar para tratar enfermedades y trastornos proliferativos de células, en particular las que afectan al sistema hematopoyético. Un número de propiedades variables de los anticuerpos, incluyendo, pero no limitadas a especificidad para la diana, capacidad de mediar mecanismos efectores inmunitarios, y larga semivida en suero, hacen los anticuerpos fármacos poderosos. La presente invención describe anticuerpos contra el protooncogén FLT3.

Se ha encontrado que FLT3 desempeña un papel significativo en el inicio y evolución de leucemias, en particular, LMA, y los primeros ensayos con inhibidores de FLT3 en pacientes de LMA han mostrado resultados prometedores. Sin embargo, aún existe la necesidad para anticuerpos anti-FLT3 que sean útiles en el tratamiento de leucemias, tal como LMA.

El éxito clínico de los anticuerpos dirigidos contra FLT3 depende de su(s) potencial(es) mecanismo(s) de acción. Hay un número de posibles mecanismos por los cuales los anticuerpos median efectos celulares, incluyendo anti-proliferación mediante el bloqueo de rutas de crecimiento necesarias, señalización intracelular que produce apoptosis, disminución y/o recambio aumentado de receptores, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y fomento de una respuesta inmunitaria adaptativa (Cragg et al, 1999, Curr Opin Immunol 11 541- 547, Glennie of al, 2000, Immunol Today 21 403-410). La eficacia del anticuerpo puede ser debida a una combinación de estos mecanismos, y su importancia relativa en terapia clínica para oncología parece ser dependiente del cáncer.

La importancia de las funciones efectoras mediadas por FcγR para la actividad de algunos anticuerpos se ha demostrado en ratones (Clynes et al, 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95 652-656, Clynes et al, 2000, Nat Med 6 443-446), y de correlaciones observadas entre eficacia clínica en seres humanos y su alotipo de formas polimórficas de alta (V158) o baja (F158) afinidad de FcγRIIIa (Cartron et al, 2002, Blood 99 754-758, Weng & Levy, 2003, Journal of Clinical Oncology, 21 3940-3947). Estos datos juntos sugieren que un anticuerpo que está optimizado para unirse a ciertos FcγR puede mediar mejor las funciones efectoras, y por tanto destruir células diana más eficazmente en pacientes. Por tanto, un medio prometedor para aumentar la potencia antitumoral de anticuerpos es a través del aumento de su capacidad de mediar funciones efectoras citotóxicas tal como ADCC, ADCP y CDC. Además, los anticuerpos pueden mediar mecanismos antitumorales a través de señalización inhibitoria de crecimiento o apoptótica que se puede producir cuando un anticuerpo se une a su diana en células tumorales. Tal señalización se puede potenciar cuando los anticuerpos se presentan a las células tumorales unidos a células inmunitarias a través de FcγR. Por tanto, la afinidad aumentada de anticuerpos a FcγR puede producir efectos antiproliferativos aumentados.

Se ha alcanzado algo de éxito modificando anticuerpos con unión selectivamente aumentada a FcγR para proporcionar funcionar efectora aumentada. La manipulación de anticuerpos para función efectora optimizada se ha alcanzado usando modificaciones de aminoácidos (véase, por ejemplo, la solicitud de patente en EE UU US 2004-0132101 o la solicitud de patente en EE UU 2006-0024298).

Desgraciadamente, no se sabe a priori que mecanismos de acción pueden ser óptimos para un antígeno diana determinado. Además, no se sabe que anticuerpos pueden ser capaces de mediar un mecanismo de acción determinado contra una célula diana. En algunos casos una falta de actividad de anticuerpo, bien mediada por Fv o mediada por Fc, se puede deber a dirigirse a un epítipo en el antígeno diana que es malo para mediar tal actividad. En otros casos, el epítipo diana puede ser susceptible a una actividad mediada por Fv o mediada por Fc deseada, con todo, la afinidad (afinidad de la región Fv para antígeno o afinidad de la región Fc para receptores de Fc) puede ser insuficiente. Hacia abordar este problema, la presente invención describe modificaciones en anticuerpos anti-FLT3 que proporcionan actividades mediadas por Fc, por ejemplo, actividad medida por Fc generada de nuevo u optimizada.

Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, incluyendo seres humanos y ratones, los anticuerpos se construyen de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras apareadas. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada muestran diversidad de secuencia significativa entre anticuerpos, y son responsables de la unión al antígeno diana. Cada cadena está hecha de dominios de inmunoglobulina (Ig) individuales, y por tanto el término genérico inmunoglobulina se usa para tales proteínas.

Las unidades estructurales de anticuerpos naturales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está típicamente compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Cada una de las cadenas ligera y pesada están hechas de dos regiones distintas, denominadas como las regiones variable y constante. Para la clase IgG de inmunoglobulinas, la cadena pesada está compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina unidos de extremo N a C en el orden VH-CH1-CH2-CH3, refiriéndose al dominio variable de la cadena pesada, dominio constante de la cadena pesada 1, dominio constante de la cadena pesada 2, y dominio constante de la cadena pesada 3, respectivamente (también denominado VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3, refiriéndose al dominio variable de la cadena pesada, dominio constante gamma 1, dominio constante gamma 2, y dominio constante gamma 3, respectivamente). La cadena ligera de IgG está compuesta de dos dominios de inmunoglobulina unidos de extremo N a C en el orden VL-CL, refiriéndose al dominio variable de la cadena ligera y el dominio constante de la cadena ligera, respectivamente. Las regiones constantes muestran menos diversidad de secuencia, y son responsables de la unión a un número de proteínas naturales para provocar sucesos bioquímicos importantes.

La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión a antígeno de la molécula, y por tanto determina la especificidad de un anticuerpo para su antígeno diana. La región variable se nombra así porque es la más distinta en secuencia de otros anticuerpos con la misma clase. En la región variable, se juntan tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar un sitio de unión a antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de complementariedad (de aquí en adelante denominada una "CDR"), en las que la variación en la secuencia de aminoácidos es lo más significativa. Hay 6 CDR totales, tres por cada cadena pesada y ligera, designadas CDR1 de V_H, CDR2 de V_H, CDR3 de V_H, CDR1 de V_L, CDR2 de V_L, y CDR3 de V_L. La región variable fuera de las CDR se denomina la región marco (FR). Aunque no tan diversa como las CDR, se produce variabilidad de secuencia en la región FR entre diferentes anticuerpos. En conjunto, esta arquitectura característica de los anticuerpos proporciona un andamiaje estable (la región FR) sobre la que el sistema inmunitario puede explorar sustancial diversidad de unión a antígeno (las CDR) para obtener especificidad para una amplia gama de antígenos. Un número de estructuras de alta resolución están disponibles para una variedad de fragmentos de regiones variables de diferentes organismos, algunos no unidos y algunos en complejo con antígeno. Se divulgan la secuencia y características estructurales de regiones variables de antígenos, por ejemplo, en Morea et al., 1997, *Biophys Chem* 68:9-16; Morea et al., 2000, *Methods* 20:267- 279, y las características conservadas de anticuerpos se divulgan, por ejemplo, en Maynard et al., 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-376.

Los anticuerpos se agrupan en clases, también denominadas isotipos, determinados genéticamente por la región constante. Las cadenas ligeras constantes humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ). Las cadenas pesadas humanas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La clase IgG es la más comúnmente usada para fines terapéuticos.

Mediante "IgG" como se usa en el presente documento se quiere decir un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen gamma de inmunoglobulina reconocido. En seres humanos esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. IgM tiene subclases, incluyendo, pero no limitadas a IgM1 e IgM2. IgA tiene varias subclases, incluyendo, pero no limitadas a IgA1 e IgA2. Por tanto, "isotipo" como se usa en el presente documento quiere decir cualquiera de las clases o subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE.

También útiles para la invención pueden ser IgG que son composiciones híbridas de isotipos IgG humanos naturales. Las funciones efectoras tal como ADCC, ADCP, CDC y semivida en suero se diferencian significativamente entre las diferentes clases de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG e IgM humanas (Michaelson et al., 1992, *Molecular Immunology*, 29(3): 319-326). Un número de estudios han explorado variantes de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 para investigar los determinantes de las diferencias de las funciones efectoras entre ellas in. Véase, por ejemplo, Canfield & Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173: 1483-1491; Chappel et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(20): 9036-9040; Chappel et al., 1993, *Journal of Biological Chemistry* 268:25124- 25131; Tao et al., 1991, *J. Exp. Med.* 173: 1025-1028; Tao et al., 1993, *J. Exp. Med.* 178: 661-667; Redpath et al., 1998, *Human Immunology*, 59, 720-727.

Como se describe en la solicitud de patente en EE UU 2006-0134105 titulada "Variantes de inmunoglobulina IgG con función efectora optimizada", es posible manipular modificaciones de aminoácidos en un anticuerpo que comprende regiones constantes de otras clases de inmunoglobulinas. Tales composiciones de IgG híbridas manipuladas pueden proporcionar propiedades de función efectora mejorada, incluyendo ADCC, fagocitosis, CDC y semivida en suero mejoradas.

Como se sabe bien en la técnica, en la población humana existen polimorfismos de inmunoglobulinas. El polimorfismo Gm está determinado por los genes IGHG1, IGHG2 e IGHG3 que tienen alelos que codifican

determinantes antigénicos alotípicos denominados alotipos G1m, G2m y G3m para marcadores de las moléculas IgG1, IgG2 e IgG3 humanas (no se han encontrado alotipos Gm en la cadena gamma 4). Los marcadores se pueden clasificar en "alotipos" e "isoalotipos". Estos se distinguen en diferentes bases serológicas dependientes de las homologías de secuencia fuertes entre isotipos. Los alotipos son determinantes antigénicos especificados por formas alélicas de los genes Ig. Los alotipos representan ligeras diferencias en las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas o ligeras de diferentes individuos. Incluso una diferencia de un único aminoácido puede dar lugar a un determinante alotípico, aunque en muchos casos hay varias sustituciones de aminoácidos que se han producido. Los alotipos con diferencias de secuencia entre alelos de una subclase por lo cual antisueros reconocen solo las diferencias alélicas. Un isoalotipo es un alelo en un isotipo que produce un epítipo que está compartido con una región homóloga no polimórfica de uno o más de otros isotipos y debido a esto los antisueros reaccionarán tanto con los alotipos relevantes como los isotipos homólogos relevantes (Clark, 1997, IgG effector mechanisms, Chem. Immunol. 65-88-110, Gorman & Clark, 1990, Semin. Immunol. 2(6):457-66).

Las formas alélicas de las inmunoglobulinas humanas se han caracterizado bien. Además, se han caracterizado otros polimorfismos (Kim, et al., 2001, J. Mol. Evol. 54 1-9) Actualmente, se conocen 18 alotipos Gm: G1m (1, 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation Pergamon, Oxford, pp 43-78 (1990), Lefranc, G et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Los alotipos que se heredan en combinaciones fijadas se llaman haplotipos Gm. Los anticuerpos de la presente invención pueden estar sustancialmente codificados por cualquier alotipo, isoalotipo, o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina. Los anticuerpos de la presente invención pueden estar sustancialmente codificados por genes de cualquier organismo, por ejemplo, mamíferos, incluyendo pero no limitados a seres humanos, roedores incluyendo, pero no limitados a ratones y ratas, lagomorfos incluyendo, pero no limitados a conejos y liebres, camélidos incluyendo, pero no limitados a camellos, llamas y dromedarios, y primates no humanos incluyendo, pero no limitados a prosimios, platirrinos (monos del nuevo mundo), cercopitecos (monos del viejo mundo), y homínidos incluyendo los gibones, y grandes simios y simios menores.

En una forma de realización, los anticuerpos de la presente invención son sustancialmente humanos. Los anticuerpos de la presente invención pueden estar sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulinas que pertenecen a cualquiera de las clases de anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención comprenden secuencias que pertenecen a la clase IgG de anticuerpos, incluyendo las subclases humanas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender más de una cadena proteica. Es decir, la presente invención puede encontrar uso en un anticuerpo que es un monómero o un oligómero, incluyendo un homo- o hetero-oligómero.

Los anticuerpos de la invención se basan en secuencias de IgG humanas, y por tanto se usan secuencias de IgG humanas como las secuencias "base" contra las que se comparan otras secuencias, incluyendo, pero no limitadas a secuencias de otros organismos, por ejemplo, secuencias de roedores y primates, así como secuencias de otras clases de inmunoglobulinas tal como IgA, IgE, IgD, IgM y similares. Se contempla que, aunque los anticuerpos de la presente invención se manipulan en el contexto de un anticuerpo progenitor, las variantes se pueden manipular en o "transferir" al contexto de otro, segundo anticuerpo progenitor. Esto se hace determinando los residuos "equivalentes" o "correspondientes" y las sustituciones entre el primer y segundo anticuerpo, típicamente basadas en homología de secuencia o estructural entre las secuencias de los dos anticuerpos. Para establecer homología, la secuencia de aminoácidos de un primer anticuerpo esbozado en el presente documento se compara directamente con la secuencia de un segundo anticuerpo. Después de alinear las secuencias, usando uno o más de los programas de alineamiento de homología conocidos en la técnica (por ejemplo, usando residuos conservados como entre especies), permitiendo las inserciones y deleciones necesarias para mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de residuos conservados mediante deleción e inserción arbitraria), se definen residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria del primer anticuerpo. El alineamiento de residuos conservados puede conservar el 100% de tales residuos. Sin embargo, el alineamiento de más del 75% o de tan poco como el 50% de residuos conservados también es adecuado para definir residuos equivalentes. Los residuos equivalentes también se pueden definir determinando la homología estructural entre un primer y un segundo anticuerpo que es a nivel de estructura terciaria para anticuerpos cuya estructura se ha determinado. En este caso, los residuos equivalentes se definen como esos para los que las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácido particular del progenitor o precursor (N en N, CA en CA, C en C, y O en O) están en 0,13 nm, por ejemplo, 0,1 nm, después del alineamiento. El alineamiento se alcanza después de que el mejor modelo se haya orientado y colocado para dar la máxima superposición de coordenadas atómicas de átomos de proteína no hidrógeno de las proteínas. Independientemente de cómo se determinan los residuos equivalentes o correspondientes, e independientemente de la identidad del anticuerpo progenitor en el que se hacen los anticuerpos, lo que se pretende que se va a transmitir es que los anticuerpos descubiertos por la presente invención se pueden manipular en cualquier segundo anticuerpo progenitor que tiene homología de secuencia o estructural significativa con el anticuerpo. Por tanto, por ejemplo, si se genera un anticuerpo variante en donde el anticuerpo progenitor es IgG1 humano, usando los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar los residuos equivalentes, el anticuerpo variante se puede manipular en un anticuerpo progenitor IgG2 humano, un anticuerpo progenitor IgA humano, un anticuerpo progenitor IgG2a o IgG2b de ratón, y similares. De nuevo, como se ha descrito anteriormente, el contexto de un anticuerpo progenitor no afecta la capacidad de

transferir los anticuerpos de la presente invención a otros anticuerpos progenitores. Por ejemplo, los anticuerpos variantes que se manipulan en un anticuerpo IgG1 humano que se dirige a un epítipo antigénico se pueden transferir a un anticuerpo IgG2 humano que se dirige a un epítipo antigénico diferente, y así sucesivamente.

5 En la clase IgG de inmunoglobulinas hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Mediante “dominio de inmunoglobulina (Ig)” en el presente documento se quiere decir una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria clara. De interés en la presente invención son los dominios de la cadena pesada constante incluyendo, los dominios pesados constantes (CH) y la bisagra. En el contexto de anticuerpos IgG, los isotipos IgG tienen cada uno tres regiones CH: “CH1” se refiere a las posiciones 118-220, “CH2” se refiere a las posiciones 237-340, y “CH3” se refiere a las posiciones 341-447 según el índice EU como en Kabat. Mediante “bisagra” o “región bisagra” o “región bisagra de anticuerpo” o “región bisagra de inmunoglobulina” en el presente documento se quiere decir el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG empieza en el residuo de posición EU 237. Por tanto, para IgG la bisagra se define en el presente documento para incluir las posiciones 221 (D211 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat. En algunas formas de realización, por ejemplo, en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra inferior, la “bisagra inferior” generalmente se refiere a las posiciones 226 a 230. La cadena pesada constante, como se define en el presente documento, se refiere al extremo N del dominio CH1 hasta el extremo C del dominio CH3, comprendiendo de esta manera las posiciones 118-447, en donde la numeración es según el índice EU. La cadena ligera constante comprende un único dominio, y como se define en el presente documento se refiere a las posiciones 108-214 de C κ o C λ , en donde la numeración es según el índice EU.

Específicamente incluidos en la denominación de “anticuerpo” están los anticuerpos de longitud completa. Mediante “anticuerpo de longitud completa” en el presente documento se quiere decir la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variable y constante. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, incluyendo seres humanos y ratones, el anticuerpo de longitud completa de la clase IgG es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulinas, cada par tiene una cadena ligera y una pesada, cada cadena ligera comprende dominios de inmunoglobulina VL y CL, y cada cadena pesada comprende dominios de inmunoglobulina VH, CH1 (C γ 1), CH2 (C γ 2) y CH3 (C γ 3). En algunos mamíferos, por ejemplo, en camellos y llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, cada cadena pesada comprende un dominio variable unido a la región Fc.

Alternativamente, los anticuerpos pueden ser una variedad de estructuras incluyendo, pero no limitado a fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no están limitados a anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos dominio, anticuerpos sintéticos, miméticos de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, fusiones de anticuerpos (algunas veces denominados “conjugados de anticuerpos”), y fragmentos de cada uno, respectivamente. Los fragmentos de anticuerpo específicos incluyen, pero no están limitados a, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb, que consiste en una única región variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos, (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico lo que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno, (viii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos, y (ix) “diacuerpos” o “triacuerpos”, fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica. Los fragmentos de anticuerpo se pueden modificar. Por ejemplo, las moléculas se pueden estabilizar por la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL. Se describen ejemplos de formatos y arquitecturas de anticuerpo en Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136, y Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6:343-357.

Los anticuerpos de la invención pueden incluir anticuerpos multiespecíficos, notablemente anticuerpos biespecíficos, algunas veces también denominados “diacuerpos”. Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los diacuerpos se pueden fabricar en una variedad de formas conocidas en la técnica, por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos. En una forma de realización, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas similares a anticuerpos minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio CH3. En algunos casos, el scFv se puede unir a la región Fc, y puede incluir algo o toda la región bisagra. Para una descripción de anticuerpos multiespecíficos, véase Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136.

En una forma de realización, el anticuerpo de la invención es un fragmento de anticuerpo. De interés particular son anticuerpos que comprenden regiones Fc, fusiones de Fc, y la región constante de la cadena pesada (CH1-bisagra-CH2-CH3). Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender fragmentos Fc. Un fragmento Fc de la presente invención puede comprender del 1-90% de la región Fc, por ejemplo, el 10-90%, el 30-90%, etc. Por tanto, por ejemplo, un fragmento Fc de la presente invención puede comprender un dominio C γ 2 de IgG1, un dominio C γ 2 de IgG1 y la región bisagra, un dominio C γ 3 de IgG1, y así sucesivamente. En una forma de realización, un fragmento Fc de la presente invención comprende además un compañero de fusión, haciéndolo efectivamente una fusión de fragmento Fc. Los fragmentos Fc pueden o no contener secuencia polipeptídica extra.

La inmunogenicidad es el resultado de una serie compleja de respuestas a una sustancia que se percibe como exógena, y puede incluir la producción de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes, la formación de complejos inmunitarios, activación del complemento, activación de células cebadas, inflamación, respuestas de hipersensibilidad y anafilaxis. Varios factores pueden contribuir a la inmunogenicidad de proteínas incluyendo, pero no limitado a la secuencia de la proteína, la vía y frecuencia de administración, y la población de pacientes. La inmunogenicidad puede limitar la eficacia y seguridad de un agente terapéutico proteico de múltiples maneras. La eficacia se puede reducir directamente mediante la formación de anticuerpos neutralizantes. La eficacia también se puede reducir indirectamente, ya que la unión a anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes produce una rápida depuración del suero. Se pueden producir efectos secundarios graves e incluso la muerte cuando se genera una reacción inmunitaria. Por tanto, en una forma de realización, se usa manipulación de proteínas para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos de la presente invención.

En algunas formas de realización, los componentes de andamiaje pueden ser una mezcla de diferentes especies. Tal anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto "anticuerpos quiméricos" como "anticuerpos humanizados" se refiere a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Los "anticuerpos quiméricos" tradicionalmente comprenden región(es) variable(s) de un ratón (o rata, en algunos casos) y la(s) región(es) constante(s) de un ser humano (Morrison et al, 1984, Proc Natl Acad Sci USA 81 6851-6855).

Mediante anticuerpo "humanizado" como se usa en el presente documento se quiere decir un anticuerpo que comprende una región marco (FR) humana y una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano (habitualmente de ratón o rata). El anticuerpo no humano que proporciona las CDR se llama el "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se llama el "aceptor". La humanización se basa principalmente en el injerto de CDR donantes en marcos VL y VH (humanas) aceptoras (Winter documento US 5.225.539). Esta estrategia se denomina "injerto de CDR". La "retromutación" de residuos marco aceptores seleccionados a los residuos donantes correspondientes se requiere con frecuencia para reganar la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (documento US 5.693.762). El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y por tanto típicamente comprenderá una región Fc humana. Una variedad de técnicas y métodos para humanizar y remodelar anticuerpos no humanos se conocen bien en la técnica (véase, Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (EE UU)). La humanización y otros métodos de reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de un anticuerpo no humano puede incluir métodos de remodelado, como se describe, por ejemplo, en Roguska et al., 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91 969-973). En una forma de realización, se pueden emplear métodos basados en selección para humanizar y/o madurar por afinidad regiones variables de anticuerpos, es decir, para aumentar la afinidad de la región variable por su antígeno diana. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto de solo partes de las CDR incluyendo, pero no limitados a los métodos descritos en Tan et al, 2002, J Immunol 169 1119-1125, De Pascalis et al, 2002, J Immunol 169 3076-3084. Se pueden emplear métodos basados en estructura para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe en la patente en EE UU 7.117.096 y solicitudes relacionadas.

En ciertas variaciones, la inmunogenicidad del anticuerpo se reduce usando un método descrito en la solicitud de patente en EE UU 2006-0008883, titulada "Métodos de generar proteínas variantes con contenido aumentado de cadenas del huésped y composiciones de las mismas, presentada el 3 de diciembre, 2004.

Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen la unión de péptidos procesados derivados de la secuencia progenitora a proteínas del MHC. Por ejemplo, se manipularían modificaciones de aminoácidos de modo que no haya o haya un número mínimo de epítomos inmunes que se predice se unen, con alta afinidad, a cualquier alelo de MHC prevalente. En la técnica se conocen varios métodos de identificar epítomos que se unen a MHC en secuencias de proteínas y se pueden usar para señalar epítomos en un anticuerpo de la presente invención, véase, por ejemplo, las solicitudes de patente en EE UU 2002-0119492, 2004-0230380 o 2006-0148009.

En una forma de realización alternativa, los anticuerpos de la presente invención pueden ser enteramente humanos, es decir, las secuencias de los anticuerpos son completa o sustancialmente humanas. "Anticuerpo enteramente humano" o "anticuerpo humano completo" se refiere a un anticuerpo humano que tiene la secuencia génica de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano con las modificaciones esbozadas en el presente documento. En la técnica se conocen un número de métodos para generar anticuerpos enteramente humanos, incluyendo el uso de ratones transgénicos (Bruggemann et al., 1997, Curr Opin Biotechnol 8:455-458,) o bibliotecas de anticuerpos humanos acopladas con métodos de selección (Griffiths et al., 1998, Curr Opin Biotechnol 9:102-108).

Los anticuerpos de la presente invención se dirigen a FLT3 y pueden comprender regiones variables (por ejemplo, las CDR) de cualquier anticuerpo anti-FLT3 conocido o no descubierto. Los anticuerpos de la invención pueden mostrar selectividad para FLT3. Los ejemplos incluyen de longitud completa frente a variantes de ajuste, formas de superficie celular frente a solubles, selectividad para varias variantes polimórficas, o selectividad para formas conformacionales específicas de una diana. Un anticuerpo de la presente invención se puede unir a cualquier

epítipo o región en FLT3 y puede ser específico para fragmentos, formas mutantes, formas de ajuste, o formas anómalas de los antígenos. Se han descubierto un número de anticuerpos útiles que se dirigen a FLT3 que pueden encontrar uso en la presente invención.

- 5 Los anticuerpos contra FLT3 adecuados incluyen los anticuerpos anti-FLT3 4G8 y BV10, divulgados en la patente en EE UU No. 5.777.084 y la patente en EE UU No. 6.156.882.

Los anticuerpos de la presente invención pueden encontrar uso en una amplia gama de productos. En una forma de realización el anticuerpo de la invención es un reactivo agente terapéutico, un agente diagnóstico o un de
10 investigación. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención es un agente terapéutico. Un anticuerpo de la presente invención puede encontrar uso en una composición de anticuerpo que es monoclonal o policlonal. En una forma de realización, los anticuerpos de la presente invención se usan para destruir células diana que llevan el antígeno diana, por ejemplo, células cancerosas. En una forma de realización alternativa, los anticuerpos de la
15 invención se usan para bloquear, antagonizar, o agonizar el antígeno diana. En una forma de realización alternativa, los anticuerpos de la presente invención se usan para bloquear, antagonizar, o agonizar el antígeno diana y destruir células diana que llevan el antígeno diana.

Se reconocerá que las secuencias de los dominios variables incluyendo las CDR identificadas en el presente documento se pueden combinar en cualquier combinación en un anticuerpo. Además, estas secuencias se pueden
20 modificar independientemente añadiendo todo o parte de una región Fc o variante de Fc como se divulga en el presente documento. Las secuencias modificadas también se pueden combinar en cualquier combinación en un anticuerpo.

La presente invención se dirige a anticuerpos que comprenden modificaciones, en donde las modificaciones alteran la afinidad a uno o más receptores de Fc, y/o alteran la capacidad del anticuerpo para mediar una o más funciones
25 efectoras. Las modificaciones de la invención incluyen modificaciones de aminoácidos.

Los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que introduciendo las sustituciones de aminoácidos 239D y 332E en el dominio CH2 de la parte Fc de anticuerpos anti-FLT3 conocidos, tal como 4G8 y
30 BV10 (anteriormente), la actividad destructora de células de estos anticuerpos puede aumentar significativamente o incluso detectarse o generarse por primera vez.

Esto es sorprendente, ya que se ha mostrado experimentalmente que las mismas modificaciones generalmente no aumentan la actividad destructora de células. En otras palabras, en diferentes anticuerpos dirigidos a diferentes
35 antígenos diana, la introducción de estas sustituciones no tuvo efecto medible sobre la destrucción de células.

Además, los anticuerpos inventados pueden comprender modificaciones de aminoácidos adicionales fuera de la región Fc, tal como las descritas en la patente en EE UU 7.276.585, presentada el 24 de marzo, 2005, titulada
40 "Variantes de inmunoglobulinas fuera de la región Fc".

Sustituciones adicionales que también se pueden usar en la presente invención incluyen otras sustituciones que modulan la afinidad al receptor de Fc, función efectora mediada por FcγR, y/o función efectora mediada por
complemento.

En otras formas de realización, los anticuerpos de la presente invención se pueden combinar con variantes de la cadena pesada constante que alteran la unión a FcRn. Estas incluyen modificaciones que modifican la afinidad a FcRn de una manera específica de pH. En particular, las variantes que aumentan la unión de Fc a FcRn incluyen, pero no están limitadas a 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176:346- 356, USSN 11/102621, PCT/US2003/033037,
50 PCT/US2004/011213, USSN 10/822300, USSN 10/687118, PCT/US2004/034440, USSN 10/966673), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al, Journal of Biological Chemistry, 2001 , 276(9):6591-6604, USSN 10/982470, US6737056, USSN 11/429793, USSN 11/429786, PCT/US2005/029511 , USSN 11/208422), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall Acqua et al. Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, US7083784, PCT/US97/03321, US6821505, PCT/US01/48432, USSN 11/397328), 257C, 257M, 257L, 257N, 257Y, 279E, 279Q, 279Y, inserción de Ser tras 281, 283F, 284E, 306Y, 307V, 308F, 308Y 311V, 385H, 385N, (PCT/US2005/041220, USSN 11/274065, USSN 11/436.266) 204D, 284E, 285E, 286D, y 290E (PCT/US2004/037929).

En algunas formas de realización de la invención, los anticuerpos pueden comprender modificaciones isotópicas, es decir, modificaciones en una IgG progenitora al tipo de aminoácidos en una IgG alternativa.

La presente invención proporciona anticuerpos variantes que están optimizados para un número de propiedades terapéuticamente relevantes. Un anticuerpo variante comprende una o más modificaciones de aminoácidos relativo a un anticuerpo progenitor, en donde la(s) modificación(es) de aminoácidos proporciona(n) una o más propiedades optimizadas. Por tanto, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos variantes. Un anticuerpo de la
65

presente invención se diferencia en la secuencia de aminoácidos de su anticuerpo progenitor en virtud de al menos dos modificaciones de aminoácidos 239D y 332E. Además, los anticuerpos variantes de la presente invención pueden comprender más de las dos modificaciones de aminoácidos mencionadas anteriormente comparado con el progenitor, por ejemplo, desde aproximadamente tres a cincuenta modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, desde aproximadamente tres hasta diez modificaciones de aminoácidos, desde aproximadamente tres hasta aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos, etc., comparado con el progenitor. Por tanto, las secuencias de los anticuerpos variantes y las de los anticuerpos progenitores son sustancialmente homólogas. Por ejemplo, las secuencias del anticuerpo variante en el presente documento poseerán aproximadamente el 80% de homología con la secuencia del anticuerpo progenitor, por ejemplo, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% de homología, etc.

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender modificaciones de aminoácidos que proporcionan propiedades de función efectora optimizada relativo al progenitor. Se describen sustituciones y propiedades de la función efectora optimizada en la solicitud de patente en EE UU 2004-0132101, solicitud PCT US03/30249 y la patente en EE UU 7.317.091 10/822.231 (Las propiedades que se pueden optimizar incluyen, pero no están limitadas a afinidad aumentada o reducida por un FcγR. En una forma de realización, los anticuerpos de la presente invención se optimizan para poseer afinidad aumentada para un FcγR activador humano, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa y FcγRIIIb. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención se optimiza para poseer afinidad aumentada para un FcγRIIa humano. En una forma de realización alternativa, los anticuerpos se optimizan para poseer afinidad reducida para el receptor inhibitor humano FcγRIIb. Se anticipa que estas formas de realización proporcionan anticuerpos con propiedades terapéuticas aumentadas en seres humanos, por ejemplo, función efectora aumentada y mayor potencia anticancerosa.

En otras formas de realización, los anticuerpos de la presente invención proporcionan afinidad aumentada para uno o más FcγR, no obstante afinidad reducida para uno o más otros FcγR. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención puede tener unión aumentada a FcγRIIIa, no obstante unión reducida a FcγRIIb. Alternativamente, un anticuerpo de la presente invención puede tener unión aumentada a FcγRIIa y FcγRI, no obstante unión reducida a FcγRIIb.

Las modificaciones de la invención pueden aumentar la afinidad de unión para uno o más FcγR. Mediante "mayor afinidad" o "afinidad mejorada" o "afinidad aumentada" o "mejor afinidad" que una inmunoglobulina progenitora, como se usa en el presente documento se quiere decir que una variante de Fc se une a un receptor de Fc con una constante de asociación (K_a) de equilibrio significativamente mayor o constante de disociación (K_d) de equilibrio menor que el polipéptido progenitor cuando las cantidades de polipéptido variante y progenitor en el ensayo de unión son esencialmente iguales. Por ejemplo, la variante de Fc con afinidad de unión a FcγR mejorada puede mostrar desde aproximadamente 5 veces hasta aproximadamente 1000 veces, por ejemplo, desde aproximadamente 10 veces a aproximadamente 500 veces de mejora en afinidad de unión al receptor de Fc comparado con el polipéptido progenitor, donde la afinidad de unión al receptor de Fc se determina por métodos conocidos en la técnica. Según esto, mediante "afinidad reducida" comparado con un polipéptido Fc progenitor como se usa en el presente documento se quiere decir que una variante de Fc se une a un receptor de Fc con K_a significativamente menor o K_d mayor que el polipéptido progenitor.

Formas de realización comprenden la optimización de la unión de Fc a un FcγR humano, sin embargo, en formas de realización alternativas los anticuerpos de la presente invención poseen afinidad aumentada o reducida para FcγR de organismos no humanos incluyendo, pero no limitado a roedores y primates no humanos. Los anticuerpos que se optimizan para unión a FcγR no humanos pueden encontrar uso en experimentación. Por ejemplo, están disponibles modelos de ratón para una variedad de enfermedades que permiten el ensayo de propiedades tal como eficacia, toxicidad, y farmacocinética para un candidato fármaco determinado. Como se sabe en la técnica, se pueden injertar o inyectar células cancerosas en un ratón para mimetizar un cáncer humano, un proceso denominado xenoinjerto. Los ensayos de anticuerpos que comprenden anticuerpos que están optimizados para uno o más FcγR de ratón, pueden proporcionar información valiosa con respecto a la eficacia de la proteína, su mecanismo de acción, y similares. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden optimizar para funcionalidad y/o propiedades de solución aumentadas en forma aglucosilada. En una forma de realización, los anticuerpos aglucosilados de la presente invención se unen a un ligando de Fc con mayor afinidad que la forma aglucosilada del anticuerpo progenitor. Los ligandos de Fc incluyen, pero no están limitados a los FcγR, C1q, FcRn, y proteína A y G, y pueden ser de cualquier fuente incluyendo, pero no limitado a ser humano, ratón, rata, conejo, o mono. En una forma de realización alternativa, los anticuerpos se optimizan para ser más estables y/o más solubles que la forma aglucosilada del anticuerpo progenitor.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender modificaciones que modulan la interacción con ligandos de Fc diferentes de los FcγR, incluyendo, pero no limitados a proteínas del complemento, FcRn y homólogos del receptor de Fc (FcRH). Los FcRH incluyen, pero no están limitados a FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5, y FcRH6 (Davis et al, 2002, Immunol. Reviews 190:123-136).

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan propiedades optimizadas que no están específicamente relacionadas con la función efectora por sí. Las

modificaciones pueden ser modificaciones de aminoácidos, o pueden ser modificaciones que se hacen enzimática o químicamente. Tal(es) modificación(es) es probable que proporcionen alguna mejora en el anticuerpo, por ejemplo, un aumento en su estabilidad, solubilidad, función, o uso clínico. La presente invención contempla una variedad de mejoras que se pueden hacer acoplado los anticuerpos de la presente invención con modificaciones adicionales.

5 En una forma de realización, la región variable de un anticuerpo de la presente invención se puede madurar por afinidad, es decir, se han hecho modificaciones de aminoácidos en los dominios VH y/o VL del anticuerpo para aumentar la unión del anticuerpo a su antígeno diana. Tales tipos de modificaciones pueden mejorar la cinética de asociación y/o de disociación para unión al antígeno diana. Otras modificaciones incluyen las que mejoran la selectividad para el antígeno diana frente a dianas alternativas. Estas incluyen modificaciones que mejoran la selectividad para el antígeno expresado en células diana frente a no diana. Se pueden proporcionar otras mejoras a las propiedades de reconocimiento de la diana mediante modificaciones adicionales. Tales propiedades pueden incluir, pero no están limitadas a, propiedades cinéticas específicas (es decir, cinética de asociación y disociación), selectividad para la diana particular frente a dianas alternativas, y selectividad para una forma específica de diana frente a formas alternativas. Los ejemplos incluyen longitud completa frente a variantes de ajuste, formas en superficie celular frente a solubles, selectividad para varias variantes polimórficas, o selectividad para formas conformacionales específicas del antígeno diana.

20 Los anticuerpos de la invención pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan internalización de un anticuerpo reducida o aumentada. En una forma de realización, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar o combinar con modificaciones adicionales para reducir la internalización celular de un anticuerpo que se produce a través de la interacción con uno o más ligandos de Fc. Esta propiedad se podría esperar que aumentara la función efectora, y potencialmente redujera la inmunogenicidad de los anticuerpos de la invención. Alternativamente, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar directamente o combinados con modificaciones adicionales para aumentar la internalización celular de un anticuerpo que se produce a través de la interacción con uno o más ligandos de Fc.

30 En una forma de realización, se hacen modificaciones para mejorar propiedades biofísicas de los anticuerpos de la presente invención incluyendo, pero no limitadas a estabilidad, solubilidad, y estado oligomérico. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, sustituciones que proporcionan interacciones intramoleculares más favorables en el anticuerpo tal como para proporcionar mayor estabilidad, o sustitución de aminoácidos no polares expuestos con aminoácidos polares para mayor solubilidad. Se describen un número de fines y métodos de optimización en la solicitud de patente en EE UU 2004-0110226, que pueden encontrar uso para manipular modificaciones adicionales para optimizar adicionalmente los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden combinar con modificaciones adicionales para reducir el estado oligomérico o tamaño, de modo que se aumenta la penetración tumoral, o se aumentan las velocidades de depuración in vivo como se desee.

40 Otras modificaciones a los anticuerpos de la presente invención incluyen las que permiten la formación específica de moléculas homodiméricas u homomultiméricas. Tales modificaciones incluyen, pero no están limitadas a disulfuros manipulados, así como modificaciones químicas o métodos de agregación que pueden proporcionar un mecanismo para generar homodímeros u homomultímeros covalentes. Por ejemplo, se describen métodos de manipulación y composiciones de tales moléculas en Kan et al., 2001, J. Immunol., 2001, 166: 1320-1326; Stevenson et al., 2002, Recent Results Cancer Res. 159 104-12; documento US 5.681.566; Caron et al., 1992, J. Exp. Med. 176:1191-1195, y Shopes, 1992, J. Immunol. 148(9):2918-22. Modificaciones adicionales a las variantes de la presente invención incluyen las que permiten la formación específica de moléculas heterodiméricas, heteromultiméricas, bifuncionales y/o multifuncionales. Tales modificaciones incluyen, pero están limitadas a una o más sustituciones de aminoácidos en el dominio CH3, en el que las sustituciones reducen la formación de homodímeros y aumentan la formación de heterodímeros. Por ejemplo, se describen métodos de manipulación y composiciones de tales moléculas en Atwell et al., 1997, J. Mol. Biol. 270(1):26-35, y Carter et al., 2001, J. Immunol. Methods 248:7-15. Modificaciones adicionales incluyen modificaciones en los dominios bisagra y CH3, en los que las modificaciones reducen la propensión a formar dímeros.

55 En formas de realización adicionales, los anticuerpos de la presente invención comprenden modificaciones que eliminan sitios de degradación proteolítica. Estos pueden incluir, por ejemplo, sitios de proteasas que reducen los rendimientos de producción, así como sitios de proteasas que degradan la proteína administrada in vivo. En una forma de realización, se hacen modificaciones adicionales para eliminar sitios de degradación covalente tal como sitios de desamidación (es decir, desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo), oxidación y degradación proteolítica. Los sitios de desamidación que es particularmente útil eliminar son los que tienen propensión aumentada para desamidación incluyendo, pero no limitados a residuos de asparaginilo y glutamilo seguidos por glicinas (motivos NG y QG, respectivamente). En tales casos, la sustitución de cualquier residuo puede reducir significativamente la tendencia para desamidación. Los sitios de oxidación comunes incluyen residuos de metionina y cisteína. Otras modificaciones covalentes, que se pueden introducir o eliminar, incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de amina N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal. Las modificaciones

adicionales también pueden incluir, pero no están limitadas a modificaciones postraduccionales tal como glucosilación ligada a N o ligada a O y fosforilación.

5 Las modificaciones pueden incluir las que mejoran la expresión y/o rendimientos de purificación de huéspedes o células huéspedes comúnmente usados para la producción de productos biológicos. Estas incluyen, pero no están limitadas a varias líneas celulares de mamífero (por ejemplo, CHO), líneas celulares de levaduras, líneas celulares bacterianas, y plantas. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones para eliminar o reducir la capacidad de las cadenas pesadas de formar enlaces disulfuro intracadena.

10 Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos no naturales incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz y colaboradores, incluyendo, pero no limitado a métodos descritos por Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2):7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656):371-3, y Chin et al., 2003, Science 301(5635):964-7. En algunas formas de realización, estas modificaciones permiten la manipulación de varias propiedades funcionales, biofísicas, inmunológicas, o de fabricación discutidas anteriormente. En formas de realización adicionales, estas modificaciones permiten la modificación química adicional para otros fines. En el presente documento se contemplan otras modificaciones. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar unido a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Se pueden hacer modificaciones de aminoácidos adicionales para permitir la modificación química o postraduccionales específica o no específica de los anticuerpos. Tales modificaciones incluyen, pero no están limitadas a PEGilación y glucosilación. Las sustituciones específicas que se pueden utilizar para permitir la PEGilación incluyen, pero no están limitadas a, introducción de nuevos residuos de cisteína o aminoácidos no naturales de modo que se puedan usar químicas de acoplamiento eficaces y específicas para unir un PEG u otra fracción polimérica. La introducción de sitios de glucosilación específicos se puede lograr introduciendo nuevas secuencias N-X-T/S en los anticuerpos de la presente invención.

15 Las modificaciones covalentes de los anticuerpos están incluidas en el ámbito de esta invención, y generalmente, pero no siempre, se hacen postraduccionales. Por ejemplo, varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales.

20 En algunas formas de realización, la modificación covalente de los anticuerpos de la invención comprende la adición de uno o más marcadores. El término "grupo marcador" es cualquier marcador detectable. En algunas formas de realización, el grupo marcador se acopla al anticuerpo a través de brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial impedimento estérico. En la técnica se conocen varios métodos para marcar proteínas y se pueden usar en la realización de la presente invención. En general, los marcadores están una variedad de clases, dependiendo del ensayo en el que se van a detectar: a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados; b) marcadores magnéticos (por ejemplo partículas magnéticas); c) fracciones redox activas; d) colorantes ópticos; grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano, [beta]-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epítopos, etc.). En algunas formas de realización, el grupo marcador se acopla al anticuerpo a través de brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial impedimento estérico. En la técnica se conocen varios métodos para marcar proteínas y se pueden usar en la realización de la presente invención. Los marcadores específicos incluyen colorantes ópticos incluyendo, pero no limitados a, cromóforos, fósforos y fluoróforos, siendo los últimos específicos en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser bien flúores de "molécula pequeña" o flúores proteínicos. Mediante "marcador fluorescente" se quiere decir cualquier molécula que se puede detectar a través de sus propiedades fluorescentes inherentes.

25 En una forma de realización, los anticuerpos de la invención son "proteínas de fusión" de anticuerpos, algunas veces denominadas en el presente documento "conjugados de anticuerpo". El compañero de fusión o compañero de conjugado puede ser proteínico o no proteínico; el último generalmente se genera usando grupos funcionales en el anticuerpo y en el compañero de conjugado. Los compañeros de conjugado y fusión pueden ser cualquier molécula, incluyendo compuestos químicos de molécula pequeña y polipéptidos. Por ejemplo, se describen una variedad de conjugados de anticuerpo y métodos en Trail et al., 1999, Curr. Opin. Immunol. 11 :584-588. Los posibles compañeros de conjugado incluyen, pero no están limitados a, citoquinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosinas quinasas, y otros agentes terapéuticamente activos. En algunas formas de realización, se puede pensar en los compañeros de fusión más como cargas útiles, es decir, que el fin de un conjugado es la administración dirigida del compañero de conjugado a una célula diana, por ejemplo, una célula cancerosa o célula inmunitaria, por el anticuerpo. Por tanto, por ejemplo, la conjugación de una toxina a un anticuerpo dirige la administración de la toxina a células que expresan el antígeno diana. Como apreciará el experto en la materia, en realidad los conceptos y definiciones de fusión y conjugado se solapan. La designación de un anticuerpo como una fusión o conjugado no pretende limitarlo a ninguna forma de realización particular de la presente invención. Más bien, estos términos se usan con poca exactitud para transmitir el amplio concepto de que cualquier anticuerpo de la presente invención puede estar unido

genética, químicamente o de otra manera, a uno o más polipéptidos o moléculas para proporcionar alguna propiedad deseable.

Los conjugados adecuados incluyen, pero no están limitados a, marcadores como se describe posteriormente, fármacos y agentes citotóxicos incluyendo, pero no limitados a, fármacos citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos) o toxinas o fragmentos activos de tales toxinas. Las toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen cadena A de *difteria*, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y similares. Los agentes citotóxicos también incluyen sustancias radioquímicas hechas conjugando radioisótopos a anticuerpos, o uniendo un radionúclido a un agente quelante que se ha unido covalentemente al anticuerpo. Formas de realización adicionales utilizan calicheamicina, aunestatinas, geldanamicina, maitansina, y duocarmicinas y análogos; para los últimos, véase la solicitud de patente en EE UU 2003/0050331.

En una forma de realización, los anticuerpos de la presente invención están fusionados o conjugados a una citoquina. Mediante "citoquina" como se usa en el presente documento se pretende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intracelulares. Por ejemplo, como se describe en Penichet et al., 2001, *J Immunol Methods* 24891-101, las citoquinas se pueden fusionar a un anticuerpo para proporcionar una gama de propiedades deseables. Los ejemplos de tales citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citoquinas están hormona de crecimiento tal como hormona de crecimiento humana, N-metionil hormona de crecimiento humana, y hormona de crecimiento bovina; hormona tiroidea, tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina, prorrelaxina; hormonas glucoproteicas tal como hormona foliculoestimulante (FSH); hormona estimulantes del tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno de placenta; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana, péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina, factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nerviosos tal como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas, factores de crecimiento transformantes (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento insulinoide I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores, interferones tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimuladores de colonias (CSF) tal como CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), CSF de granulocitos (G-CSF), interleuquinas (IL) tal como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; C5a; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante, y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

En una forma de realización alternativa, los anticuerpos de la presente invención están fusionados, conjugados u operativamente unidos a una toxina incluyendo, pero no limitadas a toxinas de molécula pequeña y toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas. Por ejemplo, se describen una variedad de inmunotoxinas y métodos de inmunotoxinas en Thrush et al., 1996, *Ann. Rev. Immunol.* 14:49-71. Las toxinas de molécula pequeña incluyen, pero no están limitadas a calicheamicina, maitansina (documento US 5.208.020), tricoteno y CC1065. En una forma de realización de la invención, el anticuerpo se conjuga a una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina, por ejemplo, se puede convertir a May-SS-Me que se puede reducir a May-SH3 y hacer reaccionar con un anticuerpo modificado (Chan et al., 1992, *Cancer Research* 52 127-131) para generar un conjugado maitansinoide-anticuerpo. Otro conjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de calicheamicina. La familia calicheamicina de antibióticos es capaz de producir roturas en ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Se divulgan análogos estructurales de calicheamicina que se pueden usar, por ejemplo, en Hinman et al., 1993, *Cancer Research* 53 3336-3342, Lode et al, 1998, *Cancer Research* 58 2925-2928, documentos US 5.714.586; US 5.712.374. US 5.264.586; y US 5.773.001. Los análogos de dolastatina 10 tal como auristatina E (AE) y monometilauristatina E (MMAE) pueden encontrar uso como conjugados para los anticuerpos de la presente invención (Doronina et al., 2003, *Nat Biotechnol* 21(7):778-84; Francisco et al., 2003 *Blood* 102(4):1458-65). Las toxinas enzimáticamente activas útiles incluyen, pero no están limitadas a cadena A de *difteria*, fragmentos activos sin unión de la toxina de la *difteria*, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento PCT WO 93/21232. La presente invención contempla además un conjugado entre un anticuerpo de la presente invención y un compuesto con actividad nucleolítica, por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como desoxirribonucleasa (DNasa).

En una forma de realización alternativa, un anticuerpo de la presente invención se puede fusionar, conjugar o unir operativamente a un radioisótopo para formar un radioconjugado. Están disponibles una variedad de isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, A1211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 e isótopos radioactivos de Lu.

En aún otra forma de realización, un anticuerpo de la presente invención se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilizar en predireccionamiento tumoral en donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de depuración y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido). En una forma de realización alternativa, el anticuerpo se conjuga o une operativamente a una enzima para emplear terapia de profármaco mediada por enzima dependiente de anticuerpo (ADEPT). Se puede usar ADEPT conjugando o uniendo operativamente el anticuerpo a una enzima que activa un profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase la solicitud PCT WO 81/01145) a un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT WO 88/07378 o la patente en EE UU 4.975.278. El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma citotóxica, más activa. Las enzimas que son útiles en el método de esta invención incluyen, pero no están limitadas a fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticáncer, 5-fluorouracilo; proteasas, tal como proteasa de serrata, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tal como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos, enzimas que cortan hidratos de carbono tal como beta-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres, beta-lactamasa útil para convertir fármacos derivados con alfa-lactamas en fármacos libres, y penicilina amidasa, tal como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos como "abzimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, 1987, Nature 328. 457-458). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar para la administración de la abzima a una población de células tumorales. Se contemplan una variedad de conjugados adicionales para los anticuerpos de la presente invención. Posteriormente se describen una variedad de agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosinas quinasas, y otros agentes terapéuticos, que pueden encontrar uso como conjugados de anticuerpos.

También se contemplan como compañeros de fusión y conjugados polipéptidos Fc. Por tanto, un anticuerpo puede ser un polipéptido Fc multimérico, que comprende dos o más regiones Fc. La ventaja de tal molécula es que proporciona múltiples sitios de unión para receptores de Fc con una única molécula de proteína. En una forma de realización, las regiones Fc se pueden unir usando un enfoque de ingeniería química. Por ejemplo, se pueden unir Fab y Fc por enlaces tioéter que se originan en residuos de cisteína en las bisagras, generando moléculas tales como FabFc₂. Las regiones Fc se pueden unir usando manipulación de disulfuro y/o entrecruzamiento químico. En una forma de realización, las regiones Fc se pueden unir genéticamente. En una forma de realización, las regiones Fc en un anticuerpo se unen genéticamente para generar regiones Fc unidas en tándem como se describe en la solicitud de patente en EE UU 2005-0249723, titulada "Polipéptidos Fc con nuevos sitios de unión a ligandos de Fc". los polipéptidos Fc unidos en tándem pueden comprender dos o más regiones Fc, por ejemplo, de una a tres, dos, etc., regiones Fc. Puede ser ventajoso explorar un número de construcciones manipuladas para obtener anticuerpos unidos en homo- o heterotándem con las propiedades estructurales y funcionales más favorables. Los anticuerpos unidos en tándem pueden ser anticuerpo unidos en homotándem, es decir, un anticuerpo de un isotipo se fusiona genéticamente a otro anticuerpo del mismo isotipo. Se anticipa que, porque hay múltiples sitios de unión a FcγR, C1q, y/o FcRn en polipéptidos Fc unidos en tándem, las funciones efectoras y/o farmacocinética se pueden aumentar. En una forma de realización alternativa, anticuerpos de diferentes isotipos se pueden unir en tándem, denominado como anticuerpos unidos en heterotándem. Por ejemplo, debido a la capacidad de dirigirse a los receptores FcγR y FcγRI, un anticuerpo que se une tanto a FcγR como a FcγRI puede proporcionar una mejora clínica significativa.

Los compañeros de fusión y conjugado se pueden unir a cualquier región de un anticuerpo de la presente invención, incluyendo en los extremos N o C, o en algún residuo entre los extremos. En una forma de realización, un compañero de fusión o conjugado se une al extremo N o C del anticuerpo, por ejemplo, el extremo N. Una variedad de enlazadores puede encontrar uso en la presente invención para unir covalentemente anticuerpos a un compañero de fusión o conjugado. Mediante "enlazador", "secuencia enlazadora", "espaciador", "secuencia de anclaje" o equivalentes gramaticales de los mismos, en el presente documento se quiere decir una molécula o grupo de moléculas (tal como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y con frecuencia sirve para colocar las dos moléculas en una configuración deseable. Los enlazadores se conocen en la técnica, por ejemplo, los enlazadores homo- o heterobifuncionales son bien conocidos (véase, catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre entrecruzadores, páginas 155-200). Se pueden usar un número de estrategias para unir covalentemente moléculas. Estas incluyen, pero no están limitadas a enlaces polipeptídicos entre extremos N y C de proteínas o dominios de proteínas, enlace a través de puentes disulfuro, y enlace a través de reactivos de entrecruzamiento químico. En un aspecto de esta forma de realización, el enlazador es un enlace peptídico, generado por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. El enlazador puede contener residuos de aminoácidos que proporcionan flexibilidad. Por tanto, el péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes residuos de aminoácidos Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud que sea adecuada para unir dos moléculas de tal modo que asuman la conformación correcta una relativa a la otra de modo que retengan la

actividad deseada. Las longitudes adecuadas para este fin incluyen al menos uno y no más de 50 residuos de aminoácidos. En una forma de realización, el enlazador es desde aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud, siendo deseables enlazadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina (incluyendo, por ejemplo, $(GS)_n$, $(GSGGS)_n$, $(GGGGS)_n$ y $(GGGS)_n$), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, y otros enlazadores flexibles, como apreciarán los expertos en la materia. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteináceos incluyendo, pero no limitados a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden encontrar uso como enlazadores, es decir, pueden encontrar uso para unir los anticuerpos de la presente invención a un compañero de fusión o conjugado, o para enlazar los anticuerpos de la presente invención a un conjugado.

La presente invención proporciona métodos para producir y probar experimentalmente anticuerpos. No se pretende que los métodos descritos limiten la presente invención a ninguna aplicación o teoría de operación particular. Más bien, se pretende que los métodos proporcionados ilustren generalmente que uno o más anticuerpos se pueden producir y probar experimentalmente para obtener anticuerpos variantes. Se describen métodos generales para biología molecular, expresión, purificación y cribado de anticuerpos en *Antibody Engineering*, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001, y Hayhurst & Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5 683-689; Maynard & Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2 339-76, *Antibodies. A Laboratory Manual* por Harlow & Lane, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

En una forma de realización de la presente invención, se crean ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos, y que después se pueden clonar en células huéspedes, expresar y ensayar, si se desea. Por tanto, se pueden hacer ácidos nucleicos, y particularmente ADN, que codifiquen cada secuencia de proteína. Estas prácticas se llevan a cabo usando procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, se describen una variedad de métodos que pueden encontrar uso en la presente invención en *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3ª Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001), y *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). Como apreciarán los expertos en la materia, la generación de secuencias exactas para una biblioteca que comprende un gran número de secuencias es potencialmente cara y lleva mucho tiempo. Mediante "biblioteca" en el presente documento se quiere decir un conjunto de variantes en cualquier forma, incluyendo, pero no limitadas a una lista de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, una lista de sustituciones de ácidos nucleicos o aminoácidos en posiciones variables, una biblioteca física que comprende ácidos nucleicos que codifican las secuencias de la biblioteca, o una biblioteca física que comprende las proteínas variantes, sea en forma purificada o sin purificar. Según esto, hay una variedad de técnicas que se pueden usar para generar de forma eficaz bibliotecas de la presente invención. Tales métodos que pueden encontrar uso en la presente invención se describen o referencian en la patente en EE UU 6.403.312; la solicitud de patente en EE UU 2002-0048772, la patente en EE UU 7.315.786; la solicitud de patente en EE UU 2003-0130827, la solicitud PCT WO 01/40091 o la solicitud PCT WO 02/25588. Tales métodos incluyen, pero no están limitados a métodos de ensamblaje génico, métodos basados en PCR y métodos que usan variaciones de PCR, métodos basados en la reacción en cadena de la ligasa, métodos de oligos reunidos tal como los usados en reorganización sintética, métodos de amplificación propensos a error y métodos que usan oligos con mutaciones al azar, métodos de mutagénesis dirigida clásicos, mutagénesis en casete y otros métodos de amplificación y síntesis génica. Como se sabe en la técnica, hay una variedad de kits y métodos comercialmente disponibles para ensamblaje génico, mutagénesis, subclonación en vector, y similares, y tales productos comerciales encuentran uso en la presente invención para generar ácidos nucleicos que codifican anticuerpos.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir cultivando una célula huésped transformada con un ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica los anticuerpos, en condiciones apropiadas para inducir o producir la expresión de la proteína. Las condiciones apropiadas para la expresión variarán con la elección del vector de expresión y la célula huésped, y serán fácilmente determinadas por el experto en la materia mediante experimentación rutinaria. Se pueden usar una amplia variedad de células huésped apropiadas incluyendo, pero no limitadas a, células de mamífero, bacterias, células de insecto, y levaduras. Por ejemplo, se describen una variedad de líneas celulares que pueden encontrar uso en la presente invención en el catálogo de líneas celulares de la ATCC, disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

En una forma de realización, los anticuerpos se expresan en sistemas de expresión de mamíferos, incluyendo sistemas en los que las construcciones de expresión se introducen en las células de mamífero usando virus tal como retrovirus o adenovirus. Se puede usar cualquier célula de mamífero, por ejemplo, células humanas, de ratón, rata, hámster, primate, etc. Las células adecuadas también incluyen células de investigación conocidas incluyendo, pero no limitadas a células T Jurkat, células NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, NSO y variantes de las mismas. En una forma de realización alternativa, se expresan bibliotecas de proteínas en células bacterianas. Los sistemas de expresión bacteriana se conocen bien en la técnica, e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris*, y *Streptococcus lividans*. En formas de realización alternativas, los anticuerpos se producen en células de insecto (por ejemplo, Sf21/Sf9) o células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc.). En una forma de realización alternativa, los anticuerpos se expresan in vitro usando sistemas de traducción sin células. Los sistemas de traducción in vitro derivados tanto de células procariontas (por ejemplo, *E. coli*) como eucariotas (por ejemplo, germen de trigo, reticulocitos de conejo) están disponibles y se pueden elegir basado en los

niveles de expresión y propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, como aprecian los expertos en la materia, la traducción *in vitro* se requiere para algunas tecnologías de presentación, por ejemplo, presentación en ribosomas. Además, los anticuerpos se pueden producir por métodos de síntesis química. También sistemas transgénicos de expresión tanto en animales (por ejemplo, leche de vaca, oveja o cabra, huevos de gallina embrionados, larvas de insectos enteras, etc.) como vegetales (por ejemplo, maíz, tabaco, lentejas de agua, etc.). Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la presente invención se pueden incorporar en un vector de expresión para expresar la proteína. Se pueden utilizar una variedad de vectores de expresión para expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores extracromosómicos autoreplicantes o vectores que se integran en un genoma huésped. Los vectores de expresión se construyen para ser compatibles con el tipo de células huésped. Por tanto, los vectores de expresión que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero no están limitados a los que permiten expresión de proteínas en células de mamíferos, bacterias, células de insecto, levadura, y sistemas *in vitro*. Como se sabe en la técnica, están disponibles una variedad de vectores de expresión, comercialmente o de otra manera, que pueden encontrar uso en la presente invención para expresar anticuerpos.

Los vectores de expresión típicamente comprenden una proteína operativamente unida con secuencias control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier compañero de fusión y/o elementos adicionales. Mediante "operativamente unido" en el presente documento se quiere decir que el ácido nucleico está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador de transcripción y traducción operativamente unido al ácido nucleico que codifica el anticuerpo, y típicamente son apropiados para la célula huésped usada para expresar la proteína. En general, las secuencias reguladoras de transcripción y traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión a ribosomas, secuencias de inicio y terminación transcripcional, secuencias de inicio y terminación de traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Como también se sabe en la técnica, los vectores de expresión típicamente contienen un gen o marcador de selección para permitir la selección de células huésped transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

Los anticuerpos pueden estar operativamente unidos a un compañero de fusión para permitir el direccionamiento de la proteína expresada, purificación, cribado, presentación, y similares. Los compañeros de fusión se pueden unir a la secuencia de anticuerpo a través de una secuencia enlazadora. La secuencia enlazadora generalmente comprenderá un pequeño número de aminoácidos, típicamente menos de diez, aunque también se pueden usar enlazadores más largos. Típicamente, las secuencias enlazadoras se seleccionan para ser flexibles y resistentes a la degradación. Como apreciarán los expertos en la materia, se puede usar cualquiera de una variedad de secuencias como enlazador. Por ejemplo, una secuencia enlazadora común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Un compañero de fusión puede ser una secuencia de direccionamiento o señal que dirige el anticuerpo y cualquier compañero de fusión asociado a una localización celular deseada o al medio extracelular. Como se sabe en la técnica, ciertas secuencias de señalización pueden dirigir una proteína para que bien sea secretada al medio de crecimiento, o en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula. Un compañero de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o proteína que permite la purificación y/o cribado. Tales compañeros de fusión incluyen, pero no están limitados a etiquetas de polihistidina (etiquetas His) (por ejemplo, H6 y H10 y otras etiquetas para uso con sistemas de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) (por ejemplo, columnas de afinidad de Ni²⁺)), fusiones de GST, fusiones de MBP, etiqueta Strep, la secuencia diana de biotinylation de BSP de la enzima bacteriana BirA, y etiquetas epítopo que son objetivo de anticuerpos (por ejemplo, etiquetas c-myc, etiquetas flag, y similares). Como apreciarán los expertos en la materia, tales etiquetas pueden ser útiles para purificación, para cribado, o ambos. Por ejemplo, un anticuerpo se puede purificar usando una etiqueta His inmovilizándolo a una columna de afinidad de Ni²⁺, y después de la purificación la misma etiqueta His se puede usar para inmovilizar el anticuerpo a una placa recubierta de Ni²⁺ para realizar un ELISA u otro ensayo de unión (como se describe posteriormente). Un compañero de fusión puede permitir el uso de un método de selección para cribar anticuerpos (véase posteriormente). Los compañeros de fusión que permiten una variedad de métodos de selección se conocen bien en la técnica, y todos de estos encuentran uso en la presente invención. Por ejemplo, fusionando los miembros de una biblioteca de anticuerpos a la proteína del gen III, se puede emplear presentación en fagos (Kay et al., Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317). Los compañeros de fusión pueden permitir que los anticuerpos se marquen. Alternativamente, un compañero de fusión se puede unir a una secuencia específica en el vector de expresión, permitiendo que el compañero de fusión y anticuerpo asociado se unan de forma covalente o no covalente con el ácido nucleico que los codifica.

Los métodos de introducir ácido nucleico exógeno en células huésped se conocen bien en la técnica, y variarán con la célula huésped usada. Las técnicas incluyen, pero no están limitadas a transfección mediada por dextrano, precipitación de fosfato de calcio, tratamiento con cloruro de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección vírica o con fagos, encapsulación del/de los polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos. En el caso de células de mamífero, la transfección puede ser transitoria o estable.

En una forma de realización, los anticuerpos se purifican o aíslan después de la expresión. Las proteínas se pueden aislar o purificar en una variedad de maneras que conocen los expertos en la materia. Los métodos de purificación

estándar incluyen técnicas cromatográficas, incluyendo intercambio iónico, interacción hidrofóbica, afinidad, de tamaño o filtración en gel, y de fase reversa, llevadas a cabo a presión atmosférica o a alta presión usando sistemas tal como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, diálisis y cromatoenfoco. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración de proteínas, también son útiles. Como se sabe bien en la técnica, una variedad de proteínas naturales se une a Fc y anticuerpos, y estas proteínas encuentran uso en la presente invención para la purificación de anticuerpos. Por ejemplo, las proteínas bacterianas A y G se unen a la región Fc. Asimismo, la proteína bacteriana L se une a la región Fab de algunos anticuerpos, como por supuesto hace el antígeno diana del anticuerpo. La purificación con frecuencia se puede permitir por un compañero de fusión particular. Por ejemplo, se pueden purificar anticuerpos usando resina de glutatión si se emplea una fusión con GST, cromatografía de afinidad con Ni²⁺ si se emplea una etiqueta de His, o anticuerpo anti-flag inmovilizado si se usa una etiqueta flag. Para orientación general en técnicas de purificación adecuadas véase, por ejemplo, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3^a Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. El grado de purificación necesaria variará dependiendo en la selección o uso de los anticuerpos. En algunos casos no es necesaria purificación. Por ejemplo, en una forma de realización, si los anticuerpos se secretan, el cribado puede tener lugar directamente del medio. Como se sabe bien en la técnica, algunos métodos de selección no implican purificación de proteínas. Por tanto, por ejemplo, si una biblioteca de anticuerpos se hace en una biblioteca de presentación en fagos, la purificación de proteínas puede no realizarse.

Los anticuerpos se pueden cribar usando una variedad de métodos, incluyendo, pero no limitados a los que usan ensayos in vitro, ensayos in vivo y celulares, y tecnologías de selección. Se pueden utilizar tecnologías de automatización y cribado de alto rendimiento en los procedimientos de cribado. El cribado puede emplear el uso de un compañero de fusión o marcador. El uso de compañeros de fusión se ha discutido anteriormente. Mediante "marcado" en el presente documento se quiere decir que los anticuerpos de la invención tienen uno o más elementos, isótopos, o compuestos químicos unidos para permitir la detección en una selección. En general, los marcadores están en tres clases: a) marcadores inmunitarios, que pueden ser un epítipo incorporado como un compañero de fusión que es reconocido por un anticuerpo, b) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados, y c) marcadores de molécula pequeña, que pueden incluir colorantes fluorescentes o colorimétricos, o moléculas tales como biotina que permite otros métodos de marcaje. Los marcadores se pueden incorporar en el compuesto en cualquier posición y se pueden incorporar in vitro o in vivo durante la expresión de la proteína.

En una forma de realización, las propiedades funcionales y/o biofísicas de los anticuerpos se criban en un ensayo in vitro. Los ensayos in vitro pueden permitir un intervalo dinámico amplio para cribar propiedades de interés. Las propiedades de los anticuerpos de se pueden cribar incluyen, pero no están limitadas a estabilidad, solubilidad y afinidad por ligandos de Fc, por ejemplo, FcγR. Se pueden cribar múltiples propiedades simultánea o individualmente. Las proteínas pueden estar purificadas o sin purificar, dependiendo de los requisitos del ensayo. En una forma de realización, la selección es un ensayo de unión cualitativo o cuantitativo para unión de anticuerpos a una molécula proteica o no proteica que se sabe o piensa que se une al anticuerpo. En una forma de realización, la selección es un ensayo de unión para medir la unión al antígeno diana. En una forma de realización alternativa, la selección es un ensayo para unión de anticuerpos a un ligando de Fc incluyendo, pero no limitado a la familia de los FcγR, el receptor neonatal FcRn, la proteína del complemento C1q, y las proteínas bacterianas A y G. Los ligandos de Fc pueden ser de cualquier organismo, por ejemplo, seres humanos, ratones, ratas, conejos, monos, etc. Los ensayos de unión se pueden llevar a cabo usando una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a ensayos basados en FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) y BRET (transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia), AlphaScreen™ (Ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada), Ensayo de proximidad de centelleo, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), SPR (resonancia de plasmón de superficie, también conocido como Biacore™), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría diferencial de barrido, electroforesis en gel, y cromatografía incluyendo filtración en gel. Estos y otros métodos pueden tomar ventaja de algún compañero de fusión o marcador del anticuerpo. Los ensayos pueden emplear una variedad de métodos de detección incluyendo, pero no limitados a, marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes o isotópicos.

Las propiedades biofísicas de los anticuerpos, por ejemplo, estabilidad y solubilidad, se pueden cribar usando una variedad de métodos conocidos en la técnica. Se puede determinar la estabilidad de la proteína midiendo el equilibrio termodinámico entre los estados plegado y desnaturalizado. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se pueden desnaturalizar usando un desnaturalizante químico, calor, o pH, y esta transición se puede seguir usando métodos que incluyen, pero no están limitados a, espectroscopía de dicroísmo circular, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de absorbancia, espectroscopía de RMN, calorimetría, y proteólisis. Como apreciarán los expertos en la materia, los parámetros cinéticos de las transiciones plegada y desnaturalizada también se pueden seguir usando estas y otras técnicas. La solubilidad e integridad estructural global de un anticuerpo se pueden determinar cuantitativa o cualitativamente usando una amplia gama de métodos que se conocen en la técnica. Los métodos que pueden encontrar uso en la presente invención para caracterizar las propiedades biofísicas de los anticuerpos incluyen, electroforesis en gel, enfoque isoeléctrico, electroforesis capilar, cromatografía tal como cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa, mapeo de péptidos, mapeo de oligosacáridos, espectrometría de masas, espectroscopía de absorbancia ultravioleta, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de dicroísmo circular,

5 calorimetría isotérmica de titulación, calorimetría diferencial de barrido, ultracentrifugación analítica, dispersión
dinámica de luz, proteólisis, y entrecruzamiento, medida de turbidez, ensayos de retraso en filtro, ensayos
inmunológicos, ensayos de unión de colorante fluorescente, ensayos de tinción de proteínas, microscopía, y
detección de agregados a través de ELISA u otro ensayo de unión. También pueden encontrar uso análisis
estructurales que emplean técnicas cristalográficas de rayos X y espectroscopía de RMN. En una forma de
realización, se puede medir la estabilidad y/o solubilidad determinando la cantidad de solución de proteína después
de algún periodo de tiempo definido. En este ensayo, la proteína se puede o no exponer a alguna condición extrema,
por ejemplo, temperatura elevada, bajo pH, o la presencia de desnaturizante. Puesto que la función típicamente
requiere una proteína estable, soluble y/o bien plegada/estructurada, los ensayos funcionales y de unión
anteriormente mencionados también proporcionan formas de realizar tal medida. Por ejemplo, una solución que
comprende un anticuerpo se podría ensayar para su capacidad de unirse a un antígeno diana, después exponer a
temperatura elevada durante uno o más periodos de tiempo definidos, después ensayar para unión a antígeno otra
vez. Puesto que no se espera que una proteína desnaturizada y agregada sea capaz de unirse al antígeno, la
cantidad de actividad restante proporciona una medida de la estabilidad y solubilidad del anticuerpo.

15 Las propiedades biológicas de los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar en experimentos en
células, tejidos, y organismos enteros. Como se sabe en la técnica, los fármacos con frecuencia se prueban en
animales incluyendo, pero no limitados a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos, y monos, para medir la
eficacia de un fármaco para tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la
farmacocinética de un fármaco, toxicidad, y otras propiedades. Los animales se pueden denominar modelos de
enfermedad. Con respecto a los anticuerpos de la presente invención, surge un desafío particular cuando se usan
modelos animales para evaluar el potencial para eficacia en seres humanos de polipéptidos candidatos -esto es
debido, al menos en parte, al hecho de que los anticuerpos que tienen un efecto específico sobre la afinidad para un
receptor de Fc humano pueden no tener un efecto de afinidad similar con el receptor animal ortólogo. Estos
problemas se pueden exacerbar además por las ambigüedades inevitables asociadas con la asignación correcta de
verdaderos ortólogos (Mechetina et al., Immunogenetics, 2002 54:463-468), y el hecho de que algunos ortólogos
simplemente no existen en el animal (por ejemplo, los seres humanos poseen un FcγRIIIa mientras que los ratones
no). Los agentes terapéuticos con frecuencia se prueban en ratones incluyendo, pero no limitados a ratones
desnudos, ratones SCID, ratones con xenoinjerto, y ratones transgénicos (incluyendo con inserciones y
eliminaciones de secuencias génicas). Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que se pretende como
un agente terapéutico anticáncer se puede probar en un modelo de cáncer en ratón, por ejemplo, un ratón con
xenoinjerto. En este método, un tumor o línea celular tumoral se injerta en o se inyecta en un ratón, y posteriormente
el ratón se trata con el agente terapéutico para determinar la capacidad del anticuerpo para reducir o inhibir el
crecimiento del cáncer y metástasis. Un enfoque alternativo es el uso de un modelo murino SCID en el que ratones
inmunodeficientes se inyectan con linfocitos de sangre periférica (LSP) humanos, que confieren un sistema
inmunológico semifuncional y humano - con una gama apropiada de FcR humanos- a los ratones que se han inyectado
posteriormente con anticuerpos o polipéptidos Fc que se dirigen a las células tumorales humanas inyectadas. En tal
modelo, los polipéptidos Fc que se dirigen al antígeno deseado interactúan con los LSP humanos en el ratón para
activar funciones efectoras tumorocidas. Tal experimentación puede proporcionar datos significativos para la
determinación del potencial del anticuerpo para ser usado como un agente terapéutico. Se puede usar cualquier
organismo, por ejemplo, mamíferos, para el ensayo. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres
humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y, por tanto, se pueden usar para probar la
eficacia, toxicidad, farmacocinética, u otra propiedad de los anticuerpos de la presente invención. Finalmente, se
requieren pruebas de los anticuerpos de la presente invención en seres humanos para la aprobación como
fármacos, y por tanto por supuesto se contemplan estos experimentos. Por tanto, los anticuerpos de la presente
invención se pueden probar en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, farmacocinética
y/u otras propiedades clínicas.

50 Se realizan estudios de toxicidad para determinar los efectos relacionados con el anticuerpo o fusión de Fc que no
se pueden evaluar en perfil de farmacología estándar o se producen solo después de la administración repetida del
agente. La mayoría de las pruebas de toxicidad se realizan en dos especies -un roedor y un no roedor- para
asegurar que no se pasa por alto ningún efecto secundario inesperado antes de que nuevas entidades terapéuticas
se introduzcan en el hombre. En general, estos modelos pueden medir una variedad de toxicidades incluyendo
genotoxicidad, toxicidad crónica, inmunogenicidad, toxicidad reproductora/de desarrollo, y carcinogenicidad. En los
parámetros incluidos anteriormente están la medida estándar de consumo de alimentos, peso corporal, formación de
anticuerpos, analítica clínica, y examen macro y microscópico de órganos/tejidos estándar (por ejemplo,
cardiotoxicidad). Parámetros adicionales de medida son traumatismo del sitio de inyección y la medida de
anticuerpos neutralizantes, si hay alguno. Tradicionalmente, los agentes terapéuticos de anticuerpos monoclonales,
desnudos o conjugados, se evalúan para reactividad cruzada con tejidos normales, inmunogenicidad/producción de
anticuerpos, toxicidad del conjugado o enlazador y toxicidad 'espectadora' de especies radiomarcadas. No obstante,
tales estudios se tienen que individualizar para abordar problemas específicos y según los consejos fijados por ICH
S6 (Estudios de seguridad para productos biotecnológicos también indicada anteriormente). Como tal, los principios
generales es que los productos estén suficientemente bien caracterizados y para los que se han eliminado
impurezas/contaminantes, que el material de prueba sea comparable a lo largo del desarrollo, y conformidad GLP.

65

La farmacocinética (PK) de los anticuerpos de la invención se puede estudiar en una variedad de sistemas animales, siendo el más relevante los primates no humanos, tal como los macacos cangrejeros y monos rhesus. Se pueden evaluar administraciones i.v./s.c. únicas o repetidas sobre un intervalo de dosis de 6000 veces (0,05-300 mg/kg) para la semivida (de días a semanas) usando concentración en plasma y depuración, así como volumen de distribución en un estadio estacionario y el nivel de absorbancia sistémica se puede medir. Los ejemplos de tales parámetros de medida generalmente incluyen concentración máxima en plasma observada (C_{max}), el tiempo para alcanzar la C_{max} (T_{max}), el área bajo la curva concentración en plasma-tiempo desde el tiempo 0 hasta infinito [AUC_{0-inf}] y la semivida de eliminación aparente ($T_{1/2}$). Parámetros medidos adicionales podrían incluir análisis compartimental de datos de concentración-tiempo después de administración i.v. y biodisponibilidad. Se han establecido ejemplos de estudios farmacológicos/toxicológicos usando macaco cangrejero para Rituxan® y Zevalm® en los que anticuerpos monoclonales hacia CD20 dan reactividad cruzada. También se pueden hacer estudios de biodistribución, dosimetría (para anticuerpos radiomarcados), y PK en modelos roedores. Tales estudios evaluarían la tolerancia a todas las dosis administradas, toxicidad a tejidos locales, localización respecto a modelos animales de xenoinjerto en roedores, eliminación de células diana. Los anticuerpos de la presente invención pueden conferir farmacocinética superior en sistemas animales o en seres humanos. Por ejemplo, la unión aumentada a FcRn puede aumentar la semivida y exposición del anticuerpo terapéutico. Alternativamente, la unión disminuida a FcRn puede disminuir la semivida y exposición al fármaco que contiene Fc en casos donde la exposición reducida es favorable tal como cuando tal fármaco tiene efectos secundarios. Se sabe en la técnica que la gama de receptores de Fc se expresa diferencialmente en varios tipos de células inmunitarias, así como en diferentes tejidos. La distribución diferencial en tejidos de receptores de Fc puede finalmente tener un impacto en las propiedades farmacodinámicas (PD) y farmacocinéticas (PK) de los anticuerpos de la presente invención. Puesto que los anticuerpos de la presentación tienen afinidades variables para la gama de receptores de Fc, el cribado adicional de los polipéptidos para propiedades PD y/o PK puede ser extremadamente útil para definir el equilibrio óptimo de PD, PK y eficacia terapéutica conferida por cada polipéptido candidato.

Los estudios farmacodinámicos pueden incluir, pero no están limitados a, atacar células tumorales específicas o bloquear mecanismos de señalización, medir la eliminación de células que expresan antígeno diana, o señales, etc. Tales efectos farmacodinámicos se pueden demostrar en modelos animales o seres humanos.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para fines terapéuticos. Como apreciarán los expertos en la materia, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para cualquier fin terapéutico que use anticuerpos y similares. En una forma de realización, los anticuerpos se administran a un paciente para tratar trastornos que incluyen, pero no se limitan a cáncer.

Un "paciente" para los fines de la presente invención incluye tanto seres humanos como otros animales, por ejemplo, mamíferos, por ejemplo, seres humanos. Por tanto, los anticuerpos de la presente invención tienen aplicaciones tanto en terapia humana como veterinaria. El término "tratamiento" o "tratar" en la presente invención se pretende que incluya tratamiento terapéutico, así como medidas profilácticas, o supresoras para una enfermedad o trastorno. Por tanto, por ejemplo, la administración con éxito de un anticuerpo antes del inicio de la enfermedad produce tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración con éxito de un anticuerpo optimizado después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende tratamiento de la enfermedad. "Tratamiento" y "tratar" también abarca la administración de un anticuerpo optimizado después de la aparición de la enfermedad para erradicar la enfermedad. La administración con éxito de un agente después del inicio y después de que se hayan desarrollado los síntomas, con posible reducción de síntomas clínicos y tal vez alivio de la enfermedad, comprende tratamiento de la enfermedad. Esos "en necesidad de tratamiento" incluyen mamíferos que ya tienen la enfermedad o trastorno, así como esos propensos a tener la enfermedad o trastorno, incluyendo esos en los que la enfermedad o trastorno se tiene que prevenir.

Mediante "cáncer" y "canceroso" en el presente documento se hace referencia a o se describe el estado fisiológico en mamíferos que típicamente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no están limitados a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluyendo liposarcoma), tumores neuroendocrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias malignas linfoides.

Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen neoplasias malignas hematológicas, tal como linfomas no hodgkinianos (LNH), leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células B (B-LLA) y leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células T (T-LLA), timoma, histiocitosis de células de Langerhans, mieloma múltiple (MM), neoplasias mieloides tal como leucemias mielógenas agudas (LMA), incluyendo LMA con maduración, LMA sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos, y trastornos mieloproliferativos crónicos (MDS) incluyendo leucemia mielógena crónica (LMC).

Si el cáncer o tumor es un linfoma o leucemia, la enfermedad puede estar es un estadio de enfermedad residual mínima (ERM). Este estadio se puede, por ejemplo, alcanzar después de quimioterapia convencional con o sin trasplante de células madre. En este contexto, "ERM" se refiere a un estado de enfermedad donde pequeños números de células de linfoma/leucémicas permanecen en el paciente durante el tratamiento o después del tratamiento cuando el paciente está en remisión, incluyendo remisión completa (sin síntomas o signos de

enfermedad). Esta es la causa principal de recaída en cáncer y leucemia. En este estadio, aunque el paciente puede estar en remisión completa, la enfermedad es aún detectable mediante técnicas del estado de técnica tal como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y citometría de flujo (FACS).

5 La diana de los anticuerpos de la presente invención puede ser polimórfica en la población humana. Para un paciente o población de pacientes determinados, la eficacia de los anticuerpos de la presente invención puede estar, por tanto, afectada por la presencia o ausencia de polimorfismos específicos en proteínas. Por ejemplo, FcγRIIIA es polimórfico en la posición 158, que comúnmente es bien V (alta afinidad) o F (baja afinidad). Se observa que los
10 pacientes con el genotipo homocigoto V/V tienen una mejor respuesta clínica al tratamiento con el anticuerpos anti-CD20 Rituxan® (rituximab), probablemente porque estos pacientes montan una respuesta NK más fuerte (Dall'Ozzo et al. (2004) Cancer Res. 64-4664-9). Polimorfismos adicionales incluyen, pero no están limitados a FcγRIIIA R131 o H131, y se sabe que tales polimorfismos aumentan o disminuyen la unión a Fc y posterior actividad biológica, dependiendo del polimorfismo. Los anticuerpos de la presente invención se pueden unir a una forma polimórfica particular de un receptor, por ejemplo, FcγRIIIA 158 V, o se unen con afinidad equivalente a todos los polimorfismos en una posición particular en el receptor, por ejemplo, tanto los polimorfismos 158V como 158F de FcγRIIIA. En una
15 forma de realización, los anticuerpos de la presente invención pueden tener unión equivalente a los polimorfismos que se pueden usar en un anticuerpo para eliminar la eficacia diferencial vista en pacientes con diferentes polimorfismos. Tal propiedad puede dar mayor consistencia en respuesta terapéutica y reducir las poblaciones de pacientes que no responden. Tal Fc variante con idéntica unión a polimorfismos del receptor puede tener actividad biológica aumentada, tal como ADCC, CDC o semivida circulante, o alternativamente, actividad disminuida, a través de la modulación de la unión a los receptores de Fc relevantes. En una forma de realización, los anticuerpos de la presente invención se pueden unir con mayor o menor afinidad a uno de los polimorfismos de un receptor, bien
20 accentuando la diferencia existente en la unión o invirtiendo la diferencia. Tal propiedad puede permitir la creación de agentes terapéuticos particularmente a medida para eficacia con una población de pacientes que poseen tal polimorfismo. Por ejemplo, una población de pacientes que posee un polimorfismo con una mayor afinidad para un receptor inhibitor tal como FcγRIIb podría recibir un fármaco que contiene un anticuerpo con unión reducida a tal forma polimórfica del receptor, creando un fármaco más eficaz.

En una forma de realización, se criban pacientes para uno o más polimorfismos para predecir la eficacia de los anticuerpos de la presente invención. Esta información se puede usar, por ejemplo, para seleccionar pacientes para incluir o excluir de ensayos clínico o, tras la aprobación, para proporcionar consejo a los médicos y pacientes respecto a dosis apropiadas y opciones de tratamiento. En una forma de realización, se seleccionan pacientes para inclusión en ensayos clínicos para un anticuerpo de la presente invención si su genotipo indica que es probable que respondan significativamente mejor a un anticuerpo de la presente invención comparado con uno o más agentes
30 terapéuticos de anticuerpo actualmente usados. En otra forma de realización, se determinan dosis y pautas de tratamiento apropiadas usando tal información de genotipo. En otra forma de realización, se seleccionan pacientes para inclusión en un ensayo clínico o para recibir terapia tras la aprobación basado en su genotipo de polimorfismo, donde tal terapia contiene un anticuerpo manipulado para ser específicamente eficaz para tal población, o alternativamente, donde tal terapia contiene un anticuerpo que no muestra actividad diferencial a las diferentes formas del polimorfismo.

Se incluyen en la presente invención pruebas diagnósticas para identificar pacientes que probablemente muestren una respuesta clínica favorable a un anticuerpo de la presente invención, o que probablemente muestren una respuesta significativamente mejor cuando se tratan con un anticuerpo de la presente invención frente a uno o más
45 agentes terapéuticos de anticuerpo usados actualmente. Se puede usar cualquier de un número de métodos para determinar los polimorfismos de FcγR en seres humanos conocidos en la técnica.

Además, la presente invención comprende pruebas pronósticas realizadas en muestras clínicas tal como muestras de sangre y tejidos. Tales pruebas pueden ensayar actividad de función efectora incluyendo, pero no limitada a ADCC, CDC, fagocitosis, y opsonización, o para destrucción, independientemente del mecanismo, de células cancerosas o patógenas de otra manera. En una forma de realización, se usan ensayos de ADCC, tal como los descritos previamente, para predecir, para un paciente específico, la eficacia de un anticuerpo determinado de la presente invención. Tal información se puede usar para identificar pacientes para inclusión o exclusión en ensayos clínicos, o para informar decisiones respecto a dosis y pautas de tratamiento adecuadas. Tal información también se
55 puede usar para seleccionar un fármaco que contiene un anticuerpo particular que muestra actividad superior en tal ensayo.

Se contemplan composiciones farmacéuticas en donde se formulan un anticuerpo de la presente invención y uno o más agentes terapéuticos. Se preparan formulaciones de los anticuerpos de la presente invención para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con soportes, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los soportes, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleados, e incluyen tampones tal como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tal como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butilortobencilico; alquilparabenos tal como metil o propil
60 65

parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tal como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; edulcorantes y otros agentes saborizantes; rellenos tal como celulosa microcristalina, lactosa, almidón de maíz y otros; agentes aglutinantes; aditivos; agentes colorantes; contraiones formadores de sales tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos tal como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). En una forma de realización, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención pueden estar en forma soluble en agua, tal como estar presente como sales farmacéuticamente aceptables, que pretende incluir sales de adición tanto ácidas como básicas. "Sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable" se refiere a esas sales que retienen la eficacia biológica de las bases libres y no son biológicamente, o de otra manera indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tal como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. "Sales de adición básica farmacéuticamente aceptables" incluye las derivadas de bases inorgánicas tal como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Particularmente útiles son las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tal como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, tietilamina, tripropilamina y etanolamina. Las formulaciones que se van a usar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Un liposoma es una vesícula pequeña que comprende varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo que es útil para la administración de un agente terapéutico a un mamífero. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como los descritos en Epstein et al., 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82:3688; Hwang et al., 1980, Proc Natl Acad Sci USA, 77:4030; documentos US 4.485.045; US 4.544.545; y solicitud PCT WO 97/38731. Se divulgan liposomas con tiempo de circulación aumentada en la patente en EE UU 5.013.556. Los componentes de los liposomas comúnmente se disponen en una formación en bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Se pueden generar liposomas particularmente útiles por el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Un agente quimioterapéutico u otro agente terapéuticamente activo está opcionalmente contenido en el liposoma (Gabizon et al., 1989, J National Cancer Inst 81 :1484).

El anticuerpo y otros agentes terapéuticamente activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas por métodos que incluyen, pero no están limitados a técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo, usando microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina, o microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) y macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980. Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímero hidrofóbico sólido, matrices que están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente en EE UU 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tal como Lupron Depot® (que son microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), poli-ácido-D-(-)-3-hidroxibutírico, y ProLease® (comercialmente disponible de Alkermes), que es un sistema de administración basado en microesferas compuesto de la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli-DL-lactida-co-glicolida (PLG).

La administración de la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, en forma de solución acuosa estéril, se puede hacer en una variedad de modos, incluyendo, pero no limitado a, por vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraóptica, transdérmica, tópica (por ejemplo, geles, bálsamos, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, parenteral, rectal, o intraocular. Como se sabe en la técnica, la composición farmacéutica se puede formular correspondientemente dependiendo de la manera de introducción.

Como se sabe en la técnica, los agentes terapéuticos proteicos con frecuencia se administran por infusión o bolo IV. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden administrar usando tales métodos. Por ejemplo, la administración puede ser por infusión intravenosa con cloruro de sodio al 0,9% como vehículo de infusión.

65

Además, en la técnica se conoce cualquiera de un número de sistemas de administración y se pueden usar para administrar los anticuerpos de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microesferas (por ejemplo, microesferas de PLA/PGA), y similares. Alternativamente, se puede usar un implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas o fibras. Los sistemas de liberación sostenida pueden comprender un material o matriz polimérico tal como poliésteres, hidrogeles, poli(alcohol vinílico), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tal como Lupron Depot®, y poli-ácido-D(-)-3-hidroxibutírico. También es posible administrar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, mediante infección retroviral, inyección directa, o recubrimiento con lípidos, receptores de superficie celular, u otros agentes de transfección. En todos los casos se pueden usar sistemas de liberación sostenida para liberar el anticuerpo en o cerca de la localización de acción deseada.

Las cantidades de dosificación y frecuencias de administración se seleccionan, en una forma de realización, para ser terapéutica o profilácticamente eficaces. Como se sabe en la técnica, los ajustes para degradación de proteínas, administración sistémica frente a localizada, y velocidad de nueva síntesis de proteasas, así como la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción de fármacos y gravedad del estado pueden ser necesarios, y serán determinables con experimentación rutinaria por los expertos en la materia.

La concentración del anticuerpo terapéuticamente activo en la formulación puede variar desde aproximadamente el 0,1 hasta el 100% en peso. En una forma de realización, la concentración del anticuerpo está en el intervalo de 0,003 μM a 1,0 molar. Para tratar a un paciente, se puede administrar una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la presente invención. Mediante "dosis terapéuticamente eficaz" en el presente documento se quiere decir una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del fin del tratamiento, y será determinable por un experto en la materia usando técnicas conocidas. La dosis puede variar desde 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal o mayor, por ejemplo, 0,1, 1, 10 o 50 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, de 1 a 10 mg/kg de peso corporal.

En algunas formas de realización, se usa solo una única dosis del anticuerpo. En otras formas de realización, se administran múltiples dosis del anticuerpo. El tiempo pasado entre administraciones puede ser menos de 1 hora, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-3 horas, aproximadamente 3-4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 2-4 días, aproximadamente 4-6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, o más de 2 semanas.

En otras formas de realización, los anticuerpos de la presente invención se administran en pautas posológicas metronómicas, bien por infusión continua o administración frecuente sin periodos de reposo extendidos. Tal administración metronómica puede implicar dosificar a intervalos constantes sin periodos de reposo. Típicamente tales pautas abarcan dosis baja crónica o infusión continua durante un periodo de tiempo extendido, por ejemplo, 1-2 días, 1-2 semanas, 1-2 meses, o hasta 6 meses o más. El uso de dosis menores minimiza los efectos secundarios y la necesidad para periodos de reposo.

En ciertas formas de realización el anticuerpo de la presente invención y uno o más otros agentes profilácticos o terapéuticos se administran cíclicamente al paciente. La terapia de ciclos implica la administración de un primer agente en un primer tiempo, un segundo agente en un segundo tiempo, opcionalmente agentes adicionales en tiempos adicionales, opcionalmente un periodo de reposo, y después repetir esta secuencia de administración una o más veces. El número de ciclos es típicamente desde 2-10. La terapia de ciclos puede reducir el desarrollo de resistencia a uno o más agentes, puede minimizar los efectos secundarios, o puede mejorar la eficacia del tratamiento.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar al mismo tiempo con uno o más otras pautas o agentes terapéuticos. Las pautas o agentes terapéuticos adicionales se pueden usar para mejorar la eficacia o seguridad del anticuerpo. Además, se pueden usar pautas o agentes terapéuticos adicionales para tratar la misma enfermedad o una comorbilidad más que para alterar la acción del anticuerpo. Por ejemplo, se puede administrar un anticuerpo de la presente invención al paciente junto con quimioterapia, terapia de radiación, o tanto quimioterapia como terapia de radiación. El anticuerpo de la presente invención se puede administrar en combinación con uno o más otros agentes profilácticos o terapéuticos incluyendo, pero no limitado a, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, agentes inhibidores de crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de quinasas, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, agentes inmunoestimuladores, agentes inmunosupresores, agentes que fomentan la proliferación de células hematológicas, inhibidores de angiogénesis, inhibidores de proteínas tirosinas quinasas (PTK), anticuerpos adicionales, inhibidores de Fc γ R11b u otros receptores de Fc, u otros agentes terapéuticos.

Los términos "en combinación con" y "coadministración" no están limitados a la administración de los agentes profilácticos o terapéuticos a exactamente el mismo tiempo. En su lugar, quiere decir que el anticuerpo de la presente invención y el otro agente o agentes se administran en una secuencia y en un intervalo de tiempo tal que pueden actuar juntos para proporcionar un beneficio que aumenta frente a tratamientos con solo cualquiera del

anticuerpo de la presente invención o el otro agente o agentes. En una forma de realización, el anticuerpo y el otro agente o agentes actúan aditivamente, por ejemplo, actúan sinérgicamente. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido. El médico experto puede determinar empíricamente, o considerando la farmacocinética y los modos de acción de los agentes, la dosis o las dosis apropiadas de cada agente terapéutico, así como los ritmos y métodos de administración.

En una forma de realización, los anticuerpos de la presente invención se administran con una o más moléculas adicionales que comprenden anticuerpos o Fc. Los anticuerpos de la presente invención se pueden coadministrar con uno o más otros anticuerpos de la presente invención que tienen eficacia en tratar la misma enfermedad o una comorbilidad adicional, por ejemplo, se pueden administrar dos anticuerpos que reconocen dos antígenos que se sobreexpresan en un tipo determinado de cáncer.

En una forma de realización, los anticuerpos de la presente invención se administran con un agente quimioterapéutico. Mediante "agente quimioterapéutico" como se usa en el presente documento se quiere decir un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, agentes alquilantes tal como tiotepa y ciclosfosfamida; sulfonatos de alquilo tal como busulfán, improsulfán y piposulfán, andrógenos tal como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona, anti-adrenales tal como aminoglutetimida, mitotano, trilostano, anti-andrógenos tal como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolido, y goserelina; antibióticos tal como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaseno, bleomicinas, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, caminomocina, carzinofilm, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, etreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti estrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); anti-metabolitos tal como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; aziridinas tal como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, tetilenetiofosforamida y trimetilornelamina; reaprovisionadores de ácido fólico tal como ácido frofílico; mostazas de nitrógeno tal como clorambucilo, clomafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tal como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; análogos de platino tal como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; proteínas tal como arginina desiminasa y asparaginasa; análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; texanos, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; inhibidor de timidilato sintasa (tal como Tomudex); agentes quimioterapéuticos adicionales incluyendo aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; difluorometilornitina (DMFO); elformitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracide; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazólico; triaciquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT- 11; ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina. También se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, ácidos, o derivados de cualquiera de los anteriores.

Un agente quimioterapéutico u otro citotóxico se puede administrar como un profármaco. Mediante "profármaco" como se usa en el presente documento se quiere decir una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales comparada con el fármaco progenitor y es capaz de ser enzimáticamente activada o convertida a la forma progenitora más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615th Meeting Belfast, 14:375- 382; Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery; y Borchardt et al., (ed.): 247-267, Humana Press, 1985. Los profármacos que pueden encontrar uso con la presente invención incluyen, pero no están limitados a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiosulfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos que contienen beta-lactama, profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, profármacos con 5-fluorocitosina y otra 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivar a una forma profármaco para uso con los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, cualquiera de los agentes quimioterapéuticos mencionados anteriormente.

En otra forma de realización, el anticuerpo se administra con uno o más agentes inmunomoduladores. Tales agentes pueden aumentar o disminuir la producción de una o más citoquinas, aumentar o disminuir la presentación de

autoantígenos, enmascarar antígenos de MHC, o fomentar la proliferación, diferenciación, migración, o estado de activación de uno o más tipos de células inmunitarias. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no están limitados a fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tal como aspirina ibuprofeno, celecoxib, diclofenaco, etodolac, fenoprofeno, indometacina, ketoralac, oxaprozina, nabumentona, sulindac, tolmentina, rofecoxib, naproxeno, ketoprofeno, y naburnetona, esteroides (por ejemplo, glucocorticoides, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, trimcinolona, azulfidineicosanoides tal como prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos, así como esteroides tópicos tal como antrano, calcipotrieno, clobetasol, y tazaroteno), citoquinas tal como TGF β , IFN α , IFN β , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-10, citoquina, quimioquina, o antagonistas de receptor incluyendo anticuerpos, receptores solubles, y fusiones receptor-Fe contra BAFF, B7, CCR2, CCR5, CD2, CD3, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD14, CD15, CD17, CD18, CD20, CD23, CD28, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD402, CD64, CD80, CD86, CD147, CD152, factores del complemento (C5, D) CTLA4, eotaxina, Fas, ICAM, ICOS, IFN α , IFN β , IFN γ , IFNAR, IgE, IL-1, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5R, IL-6, IL-8, IL-9 IL-12, IL-13, IL-13R1, IL-15, IL-18R, IL-23, integrinas, LFA-1, LFA-3, MHC, selectinas, TGF β , TNF α , TNF β , TNF-R1, receptor de células T, incluyendo Enbrel® (etanercept), Humira® (adalimumab), y Remicade® (infliximab), globulina anti-linfocito heteróloga; otras moléculas inmunomoduladoras tal como pirimidinas 2-amino-6-aryl-5 sustituidas, anticuerpos anti-idiotípicos para péptidos de unión a MHC y fragmentos de MHC, azatioprina, brequinar, bromocriptina, ciclofosfamida, ciclosporina A, D-penicilamina, desoxiespergual, FK506, glutaraldehído, oro, hidroxiclороquina, leflunomida, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunomida), metotrexato, minociclina, mizorribina, micofenolato mofetilo, rapamicina, y sulfasasacina.

En una forma de realización alternativa, los anticuerpos de la presente invención se administran con una citoquina. Mediante "citoquina" como se usa en el presente documento se pretende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intracelulares. Los ejemplos de tales citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citoquinas están hormona de crecimiento tal como hormona de crecimiento humana, N-metilil hormona de crecimiento humana, y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea, tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina, prerrelaxina; hormonas glucoproteicas tal como hormona foliculoestimulante (FSH); hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, latógeno de placenta; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana, péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina, factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nerviosos tal como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas, factores de crecimiento transformantes (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento insulinoide I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores, interferones tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimuladores de colonias (CSF) tal como CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), CSF de granulocitos (G-CSF), interleuquinas (IL) tal como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante, y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

En una forma de realización, se coadministran citoquinas u otros agentes que estimulan células del sistema inmunitario con el anticuerpo de la presente invención. Tal modo de tratamiento puede aumentar la función efectora deseada. Por ejemplo, se pueden coadministrar agentes que estimulan células NK incluyendo, pero no limitado a IL-2. En otra forma de realización, se pueden coadministrar agentes que estimulan macrófagos incluyendo, pero no limitado a C5a, formil péptidos tal como N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (Beigier-Bompadre et al. (2003) Scand J. Immunol. 57. 221-8). Además, se pueden administrar agentes que estimulan neutrófilos incluyendo, pero no limitados a G-CSF, GM-CSF, y similares. Además, se pueden usar agentes que fomentan la migración de tales citoquinas inmuoestimuladoras. También agentes adicionales incluyendo, pero no limitados a interferón gamma, IL-3 e IL-7 pueden fomentar una o más funciones efectoras.

En una forma de realización alternativa, citoquinas u otros agentes que inhiben la función celular efectora se coadministran con el anticuerpo de la presente invención. Tal modo de tratamiento puede limitar función efectora indeseada.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden combinar con otras pautas terapéuticas. Por ejemplo, en una forma de realización, el paciente que se va a tratar con un anticuerpo de la presente invención también puede recibir terapia de radiación. La terapia de radiación se puede administrar según protocolos comúnmente empleados en la técnica y que conoce el experto en la materia. Tal terapia incluye, pero no está limitada a radiación de cesio, iridio, yodo o cobalto. La terapia de radiación puede ser irradiación del cuerpo entero, o puede estar localmente dirigida a un sitio o tejido específico en o sobre el cuerpo, tal como el pulmón, vejiga o próstata. Típicamente, la terapia de radiación se administra en pulsos durante un periodo de tiempo desde aproximadamente 1 a 2 semanas. La terapia de radiación se puede administrar, sin embargo, durante periodos de tiempo más largos. Por ejemplo, se puede administrar terapia de radiación a pacientes que tienen cáncer de cabeza y cuello durante aproximadamente 6 a aproximadamente 7 semanas. Opcionalmente, la terapia de radiación se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples, secuenciales. El médico experto puede determinar empíricamente la dosis o las dosis apropiadas de terapia de radiación útiles en el presente documento. Según otra forma de realización de la invención, el anticuerpo de la presente invención y uno o más otras terapias anticáncer se emplean para tratar células

5 cancerosas ex vivo. Se contempla que tal tratamiento ex vivo pueda ser útil en trasplante de médula ósea y particularmente, trasplante de médula ósea autólogo. Por ejemplo, el tratamiento de células o tejido(s) que contienen células cancerosas con anticuerpos y una o más otras terapias anticáncer, tal como se ha descrito anteriormente, se puede emplear para eliminar o sustancialmente eliminar las células cancerosas antes del trasplante en un paciente receptor.

Por supuesto se contempla que los anticuerpos de la invención se puedan emplear en combinación con aún otras técnicas terapéuticas tal como cirugía o fototerapia.

10 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, se debe entender que la invención no está limitada a las formas de realización ejemplificadas.

Ejemplos

15 Materiales y métodos

A. Cepas bacterianas y plásmidos

20 Se usó *Escherichia coli* DH5a (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) para la amplificación de plásmidos y clonación.

B. Líneas celulares

25 La línea celular de mieloma de ratón Sp2/0-Ag14 (ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, EE UU) usada para la producción de derivados de anticuerpos específicos de hum-FLT3 recombinante se cultivó en IMDM (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania) suplementado con suero fetal de ternera al 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), penicilina y estreptomycin al 1% (Lonza, Basilea, Suiza). Se seleccionaron transfectantes estables con G418 1 mg/ml (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

30 Las líneas celulares de hibridoma BV10 y 4G8, que secretan anticuerpos específicos anti FLT3 humana IgG1/k de ratón (obtenidas del Dr. H-J. Bühring, UKT, Tubinga, Alemania) se cultivaron en RPMI 1640 (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania) suplementado con suero fetal de ternera al 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), penicilina y estreptomycin al 1% (Lonza, Basilea, Suiza).

35 Se mantuvieron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), aisladas por centrifugación en gradiente de densidad (LSM 1077, Lonza, Basilea, Suiza), células de hibridoma y células NALM16 (generoso regalo de R. Handgretinger, Departamento de Pediatría, Universidad de Tubinga) en RPMI 1640, las células Sp2/0-Ag14 de ratón (ATCC; Manassas, EE UU) en medio IMDM (Lonza). Todos los medios se suplementaron con suero fetal de ternera inactivado por calor al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales, L-glutamina 2 mM y beta-mercaptopetanol 57 nM.

C. Transfectante con FLT3

45 Se obtuvo ADNc de longitud completa de FLT3 humano (GenBank #BC126350) de ImaGenes, Berlín, Alemania. El ADNc se clonó en el vector pcDNA3 usando sitios de restricción *Bam*HI y *Xba*I añadidos y se transfectó en células Sp2/0-Ag14 por electroporación.

D. Anticuerpos y citometría de flujo

50 Se compraron CD33-PE-Cy5 (clon WM53), CD34-APC (clon 581), CD45-FITC (clon HI30), CD123-PE-Cy5 (clon 9F5), CD11c-PE (clon B-1y6) y anticuerpo control de isotipo de BD Biosciences (Heidelberg, Alemania), el anticuerpo CD303-FITC de Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach, Alemania). Todos los anticuerpos se incubaron con células durante 30 minutos a 4°C. Para inmunofluorescencia indirecta, se usaron anti-fragmentos F(ab)2 de ratón de cabra o anti-fragmentos F(ab)2 humanos de cabra conjugados con PE o APC, respectivamente (Jackson ImmunoResearch, West Grove, EE UU). En varios experimentos, se combinó inmunofluorescencia directa e indirecta para análisis multidimensional añadiendo anticuerpos marcados en un paso final. Las células se analizaron en un FACSCanto II o un FACSCalibur (Becton Dickinson). Se compraron bolas para el análisis cuantitativo de inmunofluorescencia indirecta (QIFIKIT®) de Dako (Hamburgo, Alemania) y se usaron según el protocolo del fabricante. Para la cuantificación de anticuerpos humanizados no estaban disponibles bolas adecuadas. Por tanto, se calculó un índice de fluorescencia específica (IFE) dividiendo la intensidad de fluorescencia media obtenida con 4G8SDIEM por la detectada con el anticuerpo control modificado con SDIE que no se une 9.2.27. Para estos experimentos se usaron anticuerpo conjugados a PE generados con el kit de conjugación de anticuerpos Lynx rapid PE (AbD Serotec, Dusseldorf, Alemania). Se compró ligando de FLT3 recombinante (rFLT3L) de Peprotech EC (Londres, Gran Bretaña). Para los experimentos de competición, se incubaron varias concentraciones de rFLT3L con células NALM16 y BV10SDIEM o 4G8SDIEM (1 µg/ml) durante 30 minutos a 4°C y se analizaron por 65 inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.

E. Ensayo de absorción de 3[H]-metil-timidina

Se sembraron 2×10^5 blastocitos de LMA en triplicados en placas de 96 pocillos y se incubaron con varias concentraciones de anticuerpos optimizados. Después de 24 horas, las células se pulsaron durante otras 20 horas con 3[H]-metil-timidina (0,5 μ Ci/pocillo) y se recogieron en un filtro de almohadilla. Se determinó la radioactividad incorporada por conteo de centelleo líquido en un contador 2450 Microplate (Perkin Elmer, Waltham, EE UU).

F. Ensayos de liberación de 51[Cr]

Se usaron como dianas células NALM16 y blastocitos de LMA primarios. Para separar los blastocitos y células efectoras a partir de las preparaciones de CMSP de pacientes de leucemia, las células se marcaron con microbolas con CD34 y CD33 y se separaron en columnas de LD según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotech). El número de blastocitos contaminantes en la población de células efectoras negativamente seleccionada se determinó por análisis de FACS y varió entre el 1% y el 10% dependiendo de la contaminación inicial de blastocitos. En algunos experimentos se usaron CD marcadas como células diana. Los ensayos de liberación de cromo se realizaron como se ha descrito previamente (Otz T, Grosse-Hovest L, Hofmann M, Rammensee HG, Jung G. A bispecific singlechain antibody that mediates target cell-restricted, supra-agonistic CD28 stimulation and killing of lymphoma cells. *Leukemia*. 2009;23(1):71-77). Brevemente, se incubaron células diana marcadas y CMSP a 37°C durante 4 o 8 horas en placas de 96 pocillos de fondo plano en presencia de varias concentraciones de anticuerpos a una proporción CMSP:diana de 50:1. Se calculó el porcentaje de liberación de 51[Cr] específico según la fórmula [cpm (prueba) - cpm (espontánea)] / [cpm (lisis con triton)] - cpm (espontánea)]. Si se usaron blastocitos leucémicos como dianas la adición de células efectoras sin anticuerpo redujo la liberación de 51[Cr] espontánea en algunos experimentos produciendo valores negativos para la liberación específica.

G. Desplazamiento antigénico

Se incubaron células NALM16 o blastocitos de LMA con varias concentraciones de 4G8SDIEM o BV10SDIEM en medio RPMI 1640. Después de 24 o 48 horas las células se lavaron con tampón de FACS enfriado en hielo, se incubaron con una concentración saturante de 4G8SDIEM (2 μ g/ml) durante 30 minutos a 4°C, se tiñeron con anti-fragmentos F(ab)2 humanos de cabra conjugado a PE y se analizaron por FACS. Se calculó la expresión en superficie relativa de FLT3 definiendo la intensidad de fluorescencia media de células preincubadas sin anticuerpos como el 100%.

H. Aislamiento y maduración de células dendríticas (CD)

Se aislaron CD de preparaciones de capas leucocíticas de individuos sanos usando el kit de aislamiento de CD de sangre II según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotech). Se tiñeron los subconjuntos mielóide (mCD) y plasmacitoide (pCD) con una mezcla de anticuerpos CD11c-PE, CD303-FITC y CD123-PE-Cy5. Para la generación *in vitro* de mCD, se sembraron 1×10^8 CMSP de individuos sanos en 10 ml de medio X-Vivo15 (Gibco, Darmstadt, Alemania). Después de 2 horas a 37°C las células adherentes se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con GM-CSF 50 ng/ml e IL-14 (20 ng/ml) durante 5 días. El día 6 se añadió LPS (100 ng/ml). Las células se recogieron el día 7 y se analizaron por citometría de flujo.

I. Ensayo de unidad formadora de colonias

Se obtuvieron células de médula ósea por lavado de la cabeza femoral de pacientes sometidos a cirugía de cadera. Las células se purificaron por centrifugación en gradiente de densidad y se sembraron a 107/ml en medio RPMI 1640 que contenía 5 μ g/ml de 4G8SDIEM o 9.2.27SDIE. Después de 24 horas de incubación las células se transfirieron a medio de metilcelulosa que contenía anticuerpo (5 μ g/ml) (10.000 células/ml, MethoCult H4434 clásico, Stemcell Technologies, Grenoble, Francia). El ensayo se realizó en triplicados. Después de 12 días las colonias se contaron y clasificaron.

Ejemplo 1: Identificación de secuencias desconocidas de anticuerpos específicos para FLT3A. Clonación del ADN que codifica las regiones V

La clonación de las regiones V se hizo por PCR. La mayoría de las técnicas empiezan de ARNm y hacen uso de la similitud de las regiones V de anticuerpos (Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Muller, M., Perry, H.M., Gottesman, K.S. Sequences of Proteins of immunological interest, 4ª ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. 1987) lo que hace posible el diseño de cebadores degenerados para amplificación por PCR (Larrick, J.W., Daniellson, L., Brenner, C.A., Wallace, E.F., Abrahamson, M., Fry, K.E., Borrebaeck, C.A.K. Polymerase chain reaction used mixed primers: cloning of a human monoclonal antibody variable region genes from single hybridoma cells. *Bio/Technology* 7: 934938, 1989; Orlandi, R., Gussow, D.H., Jones, P.T., Winter, G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3833-3837, 1989). Sin embargo, la amplificación no sesgada de los repertorios V completos requiere conjuntos muy complejos de cebadores degenerados (Marks J.D., Hoogenboom

H.R., Bonnert T.P., McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, 1991). La clonación de regiones V con secuencias muy atípicas podría aún no ser posible mediante este enfoque. Además, la secuencia original se perderá en estas partes que están cubiertas por los cebadores. Los aminoácidos en estas regiones parecen contribuir al plegamiento correcto de las regiones CDR (Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 342: 877-883, 1989). Por esta razón, la clonación de las regiones V mediante el uso de cebadores degenerados podría producir afinidad de anticuerpos reducida. Un método para soslayar estos potenciales problemas es clonar ambas cadenas del anticuerpo mediante reacción en cadena de la polimerasa inversa (iPCR) con cebadores que coinciden con las secuencias de regiones constante conocidas del anticuerpo. El procedimiento de clonación se ilustra esquemáticamente en la figura 1.

Se prepararon ARN citoplásmicos de líneas celulares de hibridoma BV10 y 4G8 (Rappold I., Ziegler B.L., Köhler I., Marchetto S., Rosnet O., Birnbaum D., Simmons P.J., Zannettino A.C., Hill B., Neu S., Knapp W., Alitalo R., Alitalo K., Ullrich A., Kanz L., Btiring H.J. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood*, 90: 111-125, 1997) usando el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) aplicando un protocolo modificado para el aislamiento de ARN citoplásmico solo.

Usando cebador de oligo (dT)₁₅, se preparó un ADNc bicatenario (ADNc-bc) a partir de 0,3-2 µg de ARNm usando el sistema de síntesis de ADNc (Roche, Mannheim, Alemania). Más específicamente, para permitir la formación de extremos romos en las hebras de ADN el ADNc-bc se incubó con ADN polimerasa de T4. La mezcla de reacción se extrajo una vez con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó con etanol. El precipitado de ADNc-bc disuelto se incubó con ADN ligasa de T4 (Roche, Mannheim, Alemania) para circularizar el ADNc (Uematsu Y. A novel and rapid cloning method for the T-cell receptor variable region sequences. *Immurtogenetics*, 34:174-178, 1991). La cola de poli(A) en 3' se ligó al extremo 5' desconocido del ADNc por circularización.

B. Amplificación por PCR de los ADNc de las regiones variables de inmunoglobulinas

El uso de dos cebadores específicos de la región constante dirigidos hacia afuera (resumidos en la tabla 1) en una reacción de iPCR permitió la amplificación del ADNc entero de segmentos génicos de cadena ligera y pesada reorganizados. Se incluyeron 1-5 µl de ADNc-bc circularizado en una reacción de PCR estándar de 50 µl (HotStar Taq ADN polimerasa, Qiagen, Hilden, Alemania) con el par de cebadores Ck-for y Ck-back para la cadena ligera y el par de cebadores gamma1-for y gamma1-back para la amplificación de la cadena pesada. Los cebadores se diseñan para que hibriden con las regiones constantes de los ADNc. Se realizaron cuarenta ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: 30 s a 94°C, 1 min a 56°C, 2 min 30 s a 72°C. El producto de amplificación resultante contiene la región V completa, la región UT 5', la cola pA, la región UT 3' y está flanqueada por secuencias de regiones constantes. El ADN obtenido de la PCR inversa se separó en geles de agarosa al 1%. Las bandas de ADN del tamaño correspondiente (cadena ligera aprox. 1000 pb; cadena pesada aprox. 1600 bp) se cortaron, aislaron por técnicas estándar (Maniatis et al. 1982) y se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI; EE UU). Para la determinación de la secuencia se usaron cebadores estándar para el sistema de vector y cebadores específicos para la región constante de inmunoglobulina (cadena ligera: k-for1 y k-for2; cadena pesada CG1-for1, CG1-for2, CG1-rev1, CG1-rev2) (véase la tabla 1).

Tabla 1: Cebadores usados para amplificación y secuenciación de las regiones VJ y VDJ de anticuerpos específicos para FLT3

Oligonucleótidos usados para la PCR inversa		
A	gamma1-for	5'-CAA GGC TTA CAA CCA CAA TCC CTG G-3' (SEQ ID NO:45)
A'	gamma1-back	5'-CAT ATG TAC AGT CCC AGA AGT ATC ATC TG-3' (SEQ ID NO:46)
B	Ck-for	5'-TGT TCA AGA AGC ACA CGA CTG AGG CAC CTC C-3' (SEQ ID NO:47)
B'	Ck-back	5'-ACT TCT ACC CCA AAG ACA TCA ATG TCA AG-3' (SEQ ID NO:48)
Oligonucleótidos usados para secuenciar		
k-for1		5'-CCT GTT GAA GCT CTT GAC AAT GGG-3' (SEQ ID NO:49)
k-for2		5'-ATG TCT TGT GAG TGG CCT CAC AGG-3' (SEQ ID NO:50)
CG1-for1		5'-CGT CTA CAG CAA GCT CAA TGT GC-3' (SEQ ID NO:51)
CG1-for2		5'-CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC-3' (SEQ ID NO:52)
CG1-rev1		5'-CCA GGT CAC TGT CAC TGG CTC AG-3' (SEQ ID NO:53)
CG1-rev2		5'-CCT CAT GTA ACA CAG AGC AGG-3' (SEQ ID NO:54)

Por tanto, se identificaron las cadenas ligeras y cadenas pesadas completas de los anticuerpos murinos 4G8 (secuencia de aminoácidos de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 15 que incluye el dominio variable (SEQ ID NO: 13), el dominio variable incluye CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2) y CDR3 (SEQ ID NO: 3); secuencia de aminoácidos de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 16, que incluye el dominio variable (SEQ ID NO: 14), el dominio variable incluye CDR1 (SEQ ID NO: 4), CDR2 (SEQ ID NO: 5) y CDR3 (SEQ ID NO: 6)) y BV10 (secuencia de aminoácidos de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 31 que incluye el dominio variable

(SEQ ID NO: 29), el dominio variable incluye CDR1 (SEQ ID NO: 7), CDR2 (SEQ ID NO: 8) y CDR3 (SEQ ID NO: 9); secuencia de aminoácidos de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 32, que incluye el dominio variable (SEQ ID NO: 30), el dominio variable incluye CDR1 (SEQ ID NO: 10), CDR2 (SEQ ID NO: 11) y CDR3 (SEQ ID NO: 12)).

5 La cadena ligera del anticuerpo 4G8 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:19 (secuencia de ADNc completa mostrada en SEQ ID NO: 20), en donde el dominio variable está codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 17. La cadena pesada del anticuerpo 4G8 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:21 (secuencia de ADNc completa mostrada en SEQ ID NO: 22), en donde el dominio variable está codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 18.

10 La cadena ligera del anticuerpo BV10 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:35 (secuencia de ADNc completa mostrada en SEQ ID NO: 36), en donde el dominio variable está codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 33. La cadena pesada del anticuerpo BV10 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:37 (secuencia de ADNc completa mostrada en SEQ ID NO: 38), en donde el dominio variable está codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 34.

Ejemplo 2: Construcción y expresión de anticuerpos específicos hacia FLT3 quiméricos y sus derivados

20 En el segundo paso de construcción de anticuerpos recombinantes, las regiones V clonadas se combinaron con las regiones C deseadas en un vector de expresión. El procedimiento de clonación realizado aquí permite la introducción de regiones V de Ig completas y su expresión en células linfoides sin ninguna alteración de su secuencia de aminoácidos. Para esto, la secuencia de nucleótidos del amplicón obtenido en el ejemplo 1 se determinó después de subclonar por secuenciación (cebador en tabla 1) y se usó para el diseño de pares de cebadores (C C'; D D'; tabla 2). Los fragmentos de ADN reamplificados de los segmentos V se cortan con las nucleasas de restricción apropiadas (resumido en la tabla 2) y después se ligan a los vectores de expresión. Los vectores (figura 2 y 3) contienen genes de regiones constante ligera y pesada humanas. Por tanto, la inserción de los segmentos V amplificados y vueltos a cortar reconstituye la organización genómica original de los genes de Ig en los vectores sin alterar ningún aminoácido de las regiones V.

30 El vector parental para la cadena ligera contiene la región VJ de la cadena ligera de ratón y la región C del gen κ humano. Se introdujeron sitios de restricción en las localizaciones requeridas (XhoI y SpeI) para sustituir el fragmento XhoI-SpeI de la cadena ligera con el fragmento VJ apropiado de la cadena ligera de los anticuerpos monoclonales BV10 o 4G8 o cualquier otro anticuerpo monoclonal. La región relevante para el intercambio de fragmentos se muestra agrandada en la figura 2. El fragmento que se va a intercambiar contiene parte del segundo exón de la secuencia líder, un sitio apropiado (XhoI) para fusión en el marco de lectura, la región VJ y parte del segundo intrón con el sitio de restricción SpeI.

40 El vector original para la cadena pesada contiene la cadena pesada de Ig isotipo γ 1 humana. Se introdujeron sitios de restricción en las posiciones requeridas en el intrón I y II para intercambio del fragmento AatII-ClaI con el fragmento VDJ de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales BV10 y 4G8 o cualquier otro anticuerpo monoclonal. La región relevante para la clonación del fragmento VDJ se muestra agrandada en la figura 3a. El fragmento que se va a intercambiar contiene partes del primer intrón con un sitio de restricción AatII, el segundo exón de la secuencia líder, la región VDJ y parte del segundo intrón con el sitio de restricción ClaI. Para la sustitución de todos los exones de la región constante, se introdujeron sitios de restricción en la posición requerida en el intrón II (MluI) y el intrón VI (SpeI). El fragmento MluI-SpeI que se va a intercambiar (mostrado agrandado en la figura 3b) contiene la región constante entera de la cadena pesada γ 1 humana y dos modificaciones de aminoácidos en el dominio CH2 como se indica (Ser₂₃₉-Asp; Ile₃₃₂-Glu).

50 Además, con los vectores de expresión usados, es posible intercambiar la región constante entera del isotipo Igy1 humano (fragmento MluI-SpeI; véase la figura 3) bien contra las regiones constantes de todos los otros isotipos de anticuerpos o contra partes Fc con función efectora optimizada o reducida. En el caso de anticuerpos optimizados para desencadenar ADCC se introdujo un intercambio S239D e I332E (posición de aminoácidos según la nomenclatura de Kabat) en el dominio CH2 de la región constante γ 1 humana. Esto se hizo según la publicación de Lazar et al. (Lazar G.A., Dang W, Karki S, Vafa O, Peng J.S., Hyun L, Chan C, Chung H.S., Eivazi A, Yoder S.C., Vielmetter J, Carmichael D.F., Hayes R.J., Dahiyat B.I. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005-4010, 2006).

Tabla 2: Oligonucleótidos usados para la amplificación de los segmentos VJ y VDJ obtenidos por iPCR para la inserción en vectores de expresión

60

Oligonucleótidos usados para el segmento VDJ de la cadena pesada		
C	4G8-H-for	5'-tct ctt cac agg tgt cct ctc tca ggt cca act gca gca gcc tgg ggc tga gc-3' (SEQ ID NO:55)
C'	4G8-H-rev	5'-gag aag gta gga ctc acc tga gga gac tgt gag agt ggt gcc ttg gcc cca g-3' (SEQ ID NO:56)
C	BV10-H-for	5'-aga cgt cca ctc tgt ctt tct ctt cac agg tgt cct ctc cca ggt gca gct gaa gca gtc-3' (SEQ ID NO:57)

C'	BV10-H-rev	5'-gag aag gta gga ctc acc tga gga gac ggt gac tga ggt tcc ttg acc c-3' (SEQ ID NO:58)
C	universal for (AatII)	5'- aga cgt cca ctc tgt ctt tct ctt cac agg tgt cct ctc c-3' (SEQ ID NO:59)
C'	universal rev (ClaI)	5'- tat cga ttt aga atg gga gaa ggt agg act cac-3' (SEQ ID NO:60)
Oligonucleótidos usados en para el segmento VJ de la cadena ligera		
D	4G8-L-for (XhoI)	5'- act cga gga gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg-3' (SEQ ID NO:61)
D'	4G8-L-rev (SpeI)	5'- tac tag tac tta cgt ttt att tcc agc ttg gtc ccc cct cc-3' (SEQ ID NO:62)
D	BV10-L-for (XhoI)	5'- act cga gga gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc c-3' (SEQ ID NO:63)
D'	BV10-L-rev (SpeI)	5'- act agt act tac gtt tca gct cca gct tgg tcc cag cac cga acg tg-3' (SEQ ID NO:64)

Los sitios de restricción se muestran negrita y se indican por letras entre paréntesis.

Por tanto, se obtuvieron anticuerpos quiméricos 4G8 y BV10 y las variantes optimizadas de Fc SDIE 4G8 y SDIE BV10. Estas comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos y nucleótidos.

5 Anticuerpo quimérico 4G8: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 23 y codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 24, secuencia de aminoácidos de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 25 y codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 26.

10 SDIE 4G8 (anticuerpo quimérico, optimizado para Fc): secuencia de aminoácidos de la cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 23 y codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 24, secuencia de aminoácidos de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 27 y codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 28.

15 Anticuerpo quimérico BV10: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 39 y codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 40, secuencia de aminoácidos de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 41 y codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 42.

20 SDIE BV10 (anticuerpo quimérico, optimizado para Fc): secuencia de aminoácidos de la cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 39 y codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 40, secuencia de aminoácidos de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 43 y codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 44.

25 **Ejemplo 3: Expresión y purificación de anticuerpo anti-FLT3**

30 La cotransfección de vectores de expresión que codifican la cadena pesada y ligera quiméricas (IgG1/k) o cadenas pesada modificadas en la línea celular de mieloma que no produce Ig Sp2/0 dio transfectomas estables que secretan anticuerpos monoclonales quiméricos que son capaces de unirse específicamente a FLT3 en células REH humanas y transfectantes FLT3 (Sp2/0).

35 Los anticuerpos quiméricos se purificaron del sobrenadante de cultivo celular por cromatografía de afinidad en proteína A.

40 **Ejemplo 4: Función efectora ADCC de anticuerpos anti-FLT3**

40 La función efectora ADCC de los anticuerpo anti-FLT3 quiméricos, optimizados para Fc 4G8-SDIE y BV10-SDIE en comparación con los anticuerpos quiméricos correspondientes sin optimización de Fc (figura 4 A y B) así como un anticuerpo anti-NG2 quimérico que comprende la misma modificación de Fc (figura 4 C) se demostró usando ensayos de liberación de cromo. Además, la actividad destructora de células de 4G8-SDIE y CMSP sin estimular en comparación con el anticuerpo de ratón parental 4G8 se mostró para blastocitos de LMA aislados de un paciente humano con leucemia mielógena aguda (figura 5). Las células diana usadas fueron:

45 NALM16: una línea celular de leucemia linfoblástica aguda (LLA), suministrador: Departamento de Oncología Pediátrica, Universidad de Tubinga, caracterización original: Minowada J et al. J Cancer Res Clin Oncol 101:91-100 (1981).

SK-Mel63: línea celular de melanoma humano, suministrador original: Dr. A. Knuth, Nordwestkrankenhaus Frankfurt/Main, Alemania.

SG3: células leucémicas, aisladas de la sangre periférica de un paciente con leucemia mielógena aguda (LMA) por centrifugación en gradiente de densidad; suministrada por el Dr. H. Salih, Departamento de Oncología Médica, Universidad de Tubinga.

- 5 Las células efectoras usadas eran células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas de la sangre de donantes sanos normales.

10 El ensayo de liberación de cromo se realizó como sigue: se marcaron 10^6 células diana con cromato de sodio (^{51}Cr , 150 $\mu\text{Ci/ml}$) durante 1 hora, se lavaron y sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos (10.000 células por pocillo). Se añadieron después CMSP y anticuerpos en las concentraciones indicadas. Después de 4 y 20 horas respectivamente se recogió sobrenadante y se contó en un contador MicroBeta. La citotoxicidad se determinó según la fórmula estándar: % de liberación de ^{51}Cr específica = (liberación experimental – liberación espontánea) : (liberación total – liberación espontánea) x 100. La liberación total y espontánea se determinaron incubando células diana en medio sin y con Triton-X100 al 2%, respectivamente.

15 Los resultados representados en las figuras 4 y 5 claramente muestran que la introducción de las modificaciones en Fc S239D e I332E en el dominio CH2 de la cadena pesada de anticuerpos quiméricos anti-Flt3 4G8 y BV10 pudo inducir actividad destructora de células significativa en ambos anticuerpos. En contraste a estos resultados, la introducción de las mismas modificaciones en un anticuerpo anti-NG2 quimérico no tuvo tal efecto. Según esto, no hay principio general que las dos modificaciones usadas pueden conferir actividad destructora de células a cualquier anticuerpo determinado, sino más bien se tienen que seleccionar cuidadosamente para cada anticuerpo monoclonal individual.

25 **Ejemplo 5: Producción y purificación de anticuerpos recombinantes y optimizados para Fc**

30 Se aisló el ARNm de los anticuerpos de ratón BV10 y 4G8 (ambos IgG1/k) de hibridomas con el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Se identificaron regiones variables desconocidas de la cadena pesada (VDJ) y ligera (VJ) por secuenciación de los amplicones de PCR inversa generados como se ha descrito previamente (Hellmann T, Grosse-Hovest L, Otz T, Krammer PH, Rammensee HG, Jung G. Construction of optimized bispecific antibodies for selective activation of the death receptor CD95. *Cancer Res.* 2008;68(4):1221-1227), usando cebadores específicos para los genes constantes de ratón para la cadena ligera (Ck-for (SEQ ID NO:47); Ck-back (SEQ ID NO:48)) y pesada (gamma1-for (SEQ ID NO:45); gamma1-back (SEQ IS NO:46)). La clonación de los genes variables del hibridoma 9.2.27 (GenBank: #AJ459796; #AJ459797), que produce un anticuerpo contra CSPG4 IgG2a/k también se ha descrito previamente (Grosse-Hovest L, Hartlapp I, Marwan W, Brem G, Rammensee HG, Jung G. A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28- stimulation and tumor cell killing. *Eur J Immunol.* 2003;33(5):1334-1340). Para la generación de anticuerpo quimerizados y optimizados, los elementos VJ y VDJ, se reamplificaron usando los oligonucleótidos enumerados en la tabla 2 y se clonaron en vectores de expresión eucariotas como se muestra en las figuras 2 y 3. Además de los intercambios de aminoácidos en S239D e I223E, la parte Fc de G1 optimizada contiene una etiqueta M C-terminal (PTHVNVSVVMAEEQKLISEEDLLR; SEQ ID NO: 66, que derivaba de las secuencias de aminoácidos PTHVNVSVVMAE (aminoácido #455-466 de la parte de la cola de Ig α 1 humana) (SEQ ID NO: 67) y el epítipo *c-myc* EQKLISEEDLLR (SEQ ID NO:68) (Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM. Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product. *Mol Cell Biol.* 1985;5(12):3610-3616). Los anticuerpos recombinantes, así como 4G8 y BV10 de ratón parentales, se purificaron de sobrenadante de cultivo de transfectantes y células de hibridoma, respectivamente, usando cromatografía de afinidad en proteína A (GE Healthcare, Múnich, Alemania). En el caso de 4G8SDIEM, se produjo un gran lote de anticuerpo (15 g) en habitaciones limpias que cumplen GMP usando tecnología desechable incluyendo un reactor de bioondas de 100 L (Satorius, Gotinga, Alemania) para la fermentación y un sistema Äkta Ready para la purificación por cromatografía de proteína A, intercambio iónico e interacción hidrofóbica (columnas MabSelect Sure y CaptoAdhere, GE Healthcare, Múnich, Alemania).

50 **Ejemplo 6: Especificidad hacia FLT3 y avidez de unión del anticuerpo**

55 Los anticuerpos de ratón parentales 4G8 y BV10 se describieron y caracterizaron originalmente como que reconocen la proteína FLT3 (Rappold I, Ziegler BL, Kohler I, et al. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood.* 1997;90(1):111-125). La figura 7A muestra que ambos anticuerpos modificados con SDIEM específicamente se unen a esta proteína en células Sp2/0 de ratón transfectadas. En la figura 7B la unión de los dos anticuerpos a células NALM16 humanas positivas para FLT3 se evalúa por citometría de flujo. Los anticuerpos no dan reacción cruzada entre sí (datos no mostrados) y, por tanto, reconocen dos epítipos espacialmente separados de la proteína FLT3. Ambos anticuerpos saturaron las moléculas de FLT3 en células NALM16 a concentraciones por debajo de 1 $\mu\text{g/ml}$. La unión del anticuerpo 4G8 quimerizado fue más fuerte que la de BV10. Esto no es debido a la quimerización u optimización ya que se observó una diferencia similar cuando se comparó la unión de las versiones parentales de ratón de 4G8 y BV10 (figura 7C). No se detectaron diferencias en unión entre las versiones quimérica y quimérica modificada con SDIEM de los anticuerpos (figura 7B). Un anticuerpo modificado con SDIE, llamado 9.2.27SDIE, dirigido contra una antígeno de superficie asociado a melanoma, no se unió a células NALM16 y se usó como un control negativo en este y varios experimentos posteriores.

Ejemplo 7: Competición con la unión del ligando de FLT3 (FLT3L)

5 En general, la interferencia con la unión del ligando natural puede contribuir a la actividad terapéutica de un anticuerpo. La figura 8A muestra que FLT3L recombinante inhibe parcialmente la unión de 4G8SDIEM, pero no de BV10SDIEM a células NALM16, lo que indica que el sitio de unión del anticuerpo 4G8 está cercano al del ligando de FLT3. Por tanto, el efecto de 4G8SDIEM sobre la proliferación espontánea de los blastocitos leucémicos de tres pacientes diferentes se evaluó *in vitro* usando el anticuerpo 9.2.27 modificado con SDIE que no se une como control. Mientras que la proliferación espontánea de las células de LMA primarias varió sustancialmente, no se observaron efectos significativos de los anticuerpos sobre la proliferación celular (figura 8B).

Ejemplo 8: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

15 La figura 9 muestra que la actividad ADCC de CMSP contra células NALM16 está marcadamente aumentada en presencia de los anticuerpos modificados con SDIEM comparada con las versiones de los anticuerpos quiméricos sin modificar. En varios experimentos, las concentraciones requeridas para alcanzar lisis comparable por anticuerpo sin modificar y modificados con SDIEM se diferenciaban por un factor de al menos 100. La destrucción por el anticuerpo 4G8SDIEM era significativamente mejor que la lograda por BV10SDIEM, en particular a bajas concentraciones. Esto corresponde a la actividad de unión moderadamente menor de BV10 (figura 7).

20 En la figura 10A la actividad ADCC de 4G8SDIEM se representa usando CMSP de tres donantes sanos (#1-3). En estos experimentos, el Acm 9.2.27 modificado con SDIE se usó como control negativo. La actividad citolítica en presencia de este reactivo no superó la de las células NK en ausencia de anticuerpos que varió entre el 0 y el 20%. En la figura 10B se muestra la actividad ADCC de CMSP de un donante sano (#2) contra blastocitos leucémicos de tres pacientes diferentes. La actividad ADCC mediada contra estos blastocitos (LMA #1, LMA #2, LMA #7), que tienen 4000, 4500 y 3200 moléculas de FLT3 por célula, respectivamente, era menos pronunciada que esa contra células NAML16 cultivadas. Requirió 8 más que 4 horas para volverse claramente detectable. Generalmente, la actividad ADCC, así como NK contra células NLAM16 y blastocitos leucémicos siguió subiendo después de 8 horas. Sin embargo, usando blastocitos primarios, era difícil prolongar más el tiempo de ensayo debido a liberación de cromosomas espontánea creciente.

35 A continuación, se evaluó la actividad ADCC de CMSP aisladas de la sangre de pacientes de LMA contra blastocitos autólogos. Para este fin, se eliminaron blastocitos leucémicos de preparaciones de CMSP y las CMSP con eliminación se usaron como células efectoras contra los blastocitos positivamente seleccionados (véase, Materiales y Métodos). En estas condiciones, se detectó lisis significativa en 2 (LMA #1, #15) de 5 experimentos independientes con blastocitos y CMSP autólogos de los pacientes respectivos (figura 10C).

Ejemplo 9: Desplazamiento antigénico

40 La modulación de la expresión del antígeno diana tras la unión del anticuerpo es un fenómeno observado con frecuencia durante la terapia de anticuerpos. En particular, se ha descrito una pérdida sostenida y completa tras el tratamiento de pacientes de LMA con una dosis saturante del anticuerpo contra CD33 Lintuzumab (Feldman EJ, Brandwein J, Stone R, et al. Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2005;23(18):4110-4116). la figura 11A representa el desplazamiento antigénico inducido después de la incubación de células NALM o blastocitos leucémicos primarios de dos pacientes (LMA #1, y #2) con varias concentraciones de 4G8SDIEM durante 48 horas. En todas estas células se observó un moderado desplazamiento antigénico que ya estaba completo después de 24 horas de incubación (datos no mostrados).

Ejemplo 10: Unión a células normales y leucémicas

55 Las figuras 11B y 11C muestran la unión del anticuerpo 4G8 de ratón parenteral y 4G8SDIEM, respectivamente, a un panel de células leucémicas obtenidas de pacientes que padecen los subtipos indicados de LMA. Se analizaron células CD33+CD45dim o CD34+CD45dim seleccionadas. Se detectó FLT3 en muestras de los 15 pacientes. El número de moléculas por células determinado por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo cuantitativa varió de 500 a 6000, ese en células NALM16 de 6000 a 9000 (figura 11B). En la figura 11C, se usó 4G8SDIEM más que 4G8 de ratón para la tinción. En este caso, se calculó un valor IFE para cuantificar la unión del anticuerpo. Para blastocitos de 4 de los 15 donantes este índice no se determinó debido a la alta reactividad inespecífica con el anticuerpo control 9.2.27SDIE. Como se esperaba, los valores de IFE de las muestras evaluables coincidieron estrechamente los números de moléculas determinados por FACS cuantitativo (Figura 11C).

65 Las figuras 12A-C muestran que la unión de 4G8 de ratón a mCD positivas para CD11c y pCD positivas para CD303 purificadas de CMSP normales era marginal como mucho. Los números de moléculas de FLT3 expresadas en estas células estaban por debajo de 100/células. Además, se generaron CD de CMSP normales. Aunque estas células expresaban grandes cantidades de los marcadores asociados a CD CD80, CD86 y CD123, la unión de anticuerpos

4G8 de nuevo apenas era detectable (datos no mostrados). Después se evaluó la unión de 4G8 de ratón a células positivas para CD34 en médula ósea normal. De nuevo, la unión del anticuerpo a células de la médula ósea de tres donantes diferentes era marginal con menos de 300 moléculas por célula (figura 12D). En resumen, la unión de anticuerpos contra FLT3 a CD y células de médula ósea normales era significativamente menor que a todas las células leucémicas que expresan FLT3 examinadas. Además, la unión a anticuerpos contra FLT3 a CMSP, trombocitos, eritrocitos y granulocitos no se observó (datos no mostrados).

Ejemplo 11: Toxicidad *in vitro*

A pesar de los niveles relativamente bajos de unión de 4G8SDIEM a células precursoras de médula ósea y CD normales, se evaluó la potencial toxicidad de este anticuerpo hacia tales células. Para este fin, se incubaron células de médula ósea con concentraciones saturantes de 4G8SDIEM y 9.2.27SDIE y se determinó la influencia de estos anticuerpos en la capacidad de las células de médula ósea de dar lugar a colonias (UFC) en medio semisólido. No se detectó influencia significativa de los anticuerpos en la capacidad formadora de UFC en dos experimentos con células de médula ósea de diferentes donantes sanos (figura 13^a). Asimismo, se incubaron CD humanas con CMSP autólogas como células efectoras. Mientras que 4G8SDIEM medió ADCC eficaz contra células NALM16, usado como control positivo, no se observó destrucción de CD autólogas (figura 13B).

Ejemplo 12: Aplicación clínica de 4G8-SDIEM

Un hombre de 30 años de edad diagnosticado en 2008 con LMA (FAB M0, 45XY, cariotipo complejo incluyendo inv(3)(q21Q26), -7), fue tratado con 4G8SDIEM. El paciente había fracasado en alcanzar remisión completa (RC) después de dos pautas diferentes de terapia de inducción. Posteriormente recibió TCM (trasplante de células madre) alógenas de un donante con HLA coincidente, recayó, recibió un TCM haploidentico de su hermana y recayó de nuevo. Se consideró tratamiento con 4G8-SDIEM y se realizaron ensayos preclínicos. El análisis por FACS de los blastocitos del paciente (CD34+) reveló expresión homogénea de FLT3 en aproximadamente 4000 moléculas/células (Figura 14^a y datos no mostrados). *In vitro*, 4G8-SDIEM indujo ADCC eficaz de células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) del paciente contra células de leucemia NALM16 y – a un menor grado- contra blastocitos autólogos (Fig. 14B, C). El paciente se trató después con dosis crecientes de 4G8-SDIEM que variaban desde 10 µg a 10 mg. Varias horas después de la primera dosis de 10 mg, 5x10⁸ CMSP donante con CD3/CD19 eliminadas de su hermana se transfirieron adoptivamente. La concentración en suero de 4G8-SDIEM alcanzó 0,8 µg/ml 1 h después de la primera dosis de 10 mg y posteriormente disminuyó a 0,3 µg/ml a las 24 h (Fig. 15^a). Durante el tratamiento se observó (i) una saturación casi completa de células leucémicas en la médula ósea (MO) (Fig. 15B), (ii) un marcado aumento de células NK activadas en la sangre periférica (SP) (Fig. 16^a) y MO (Fig. 16B) que se asoció con un aumento de los niveles en suero de la citoquina índice TNF (Fig. 16C), y (iii) una marcada reducción de los blastocitos leucémicos en la SP (Fig. 16^a). Mientras que la disminución en los blastocitos de la SP era transitoria pero casi completa, la reducción en la MO era menos pronunciada (Fig. 16B). Esto lo más probablemente es debido a la diferentes proporciones de células NK:leucémicas en los dos compartimentos: en la SP la proporción de células NK CD56+ y blastocitos era aproximadamente 1 mientras que en la MO era solo 1/7, determinado por FACS (datos no mostrados). Los efectos secundarios de tratamiento fueron leves y consistían en temperatura subfebril (máx. 38,2°C) y una intensificación transitoria de una erupción cutánea acneiforme preexistente.

A pesar de la respuesta meramente transitoria al tratamiento con anticuerpo, el paciente inesperadamente permaneció en buen estado clínico durante varios meses subiendo lentamente los recuentos de blastocitos con el mejor cuidado de apoyo e hidroxiurea. Por tanto, se realizó un segundo TCM haploidentico de un donante diferente. Después de la recuperación, el paciente había alcanzado una RC sin enfermedad residual mínima (ERM) detectable. Después se aplicaron 45,5 mg de 4G8-SDIEM en dosis crecientes. Esta vez, no se observaron ni liberación de citoquina relevante y activación de células NK pronunciada (Fig. 16D), y los efectos secundarios estaban completamente ausentes.

La invención se ha descrito en sentido amplio y genéricamente en el presente documento. Cada una de las especies más estrechas y agrupamientos subgenéricos que están en la divulgación genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimina cualquier objeto del género, independientemente de si el material escindido está o no específicamente enumerado en el presente documento. Otras formas de realización están dentro de las siguientes reivindicaciones. Además, donde se describen características o aspectos de la invención en términos de grupos de Markush, los expertos en la materia reconocerán que la invención también se describe mediante ellos en términos de cualquier miembro o subgrupo individual de los miembros del grupo de Markush.

El experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes en los mismos. Además, será enseguida aparente al experto en la materia que se pueden hacer sustituciones y modificaciones variables a la invención divulgada en el presente documento sin separarse del ámbito y espíritu de la invención. Las composiciones, métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas y compuestos específicos descritos en el presente documento son ejemplares y no se pretenden como limitaciones en el ámbito de la invención. Cambios en

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 4
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <221> CDR1 de VH de 4G8
 10 <400> 4
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5
 <210> 5
 15 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <221> CDR2 de VH de 4G8
 <400> 5
 Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Asp
 25 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <221> CDR3 de VH de 4G8
 <400> 6
 Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe Asp Phe
 1 5
 35 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <221> CDR1 de VL de BV10
 <400> 7
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Met
 1 5 10 15
 45 Ala
 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 <221> CDR2 de VL de BV10

ES 2 573 642 T3

<400> 8
 Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

5 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> CDR3 de VL de BV10

<400> 9
 Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

15 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <221> CDR1 de VH de BV10

<400> 10
 Asn Tyr Gly Leu His
 1 5

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

30 <220>
 <221> CDR2 de VH de BV10

<400> 11
 Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser
 1 5 10 15

35 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <221> CDR3 de VH de BV10

45 <400> 12
 Lys Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Asn His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

50 <210> 13
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Segmento VJ de VL de 4G8

55 <400> 13

ES 2 573 642 T3

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

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 14

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<221> Segmento VDJ de VH de 4G8

<400> 14

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

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

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

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 15
 Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Val Thr Pro Gly Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Ile Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
 85 90 95
 Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn
 100 105 110
 Thr Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 130 135 140
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 210 215 220
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

10

<210> 16
 <211> 461

ES 2 573 642 T3

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ser	Thr	Ala	Thr	Gly	
1				5					10					15		
Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	
			20					25					30			
Pro	Gly	Ala	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	
		35					40					45				
Thr	Ser	Tyr	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Leu	
	50					55					60					
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Asn	
65					70					75					80	
Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Asn	
				85					90					95		
Thr	Ala	Tyr	Met	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val	
			100					105					110			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Thr	Thr	Pro	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	
		115					120					125				
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	
	130					135					140					
Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	
145					150					155					160	
Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
				165					170					175		
5	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala

ES 2 573 642 T3

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

5 <210> 17
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDS del segmento VJ de VL de 4G8

<400> 17
 gatattgtgc taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagcgtcagt 60
 ctttctctgca gggccagcca gagtattagc aacaacctac actggtatca acaaaaatca 120
 catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc 180
 aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcaactctca gtatcaacag tgtggagact 240
 gaagattttg gagtgtattt ctgtcaacag agtaaacacct ggccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa acgg 324

15 <210> 18
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDS del segmento VDJ de VL de 4G8

<400> 18
 caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc attgaagctg 60
 tcctgcaagt cttccgggta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcagagg 120
 cctggacatg gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgacagtta taaagactac 180
 aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtggaca gatcctccaa cacagcctac 240
 atgcacctca gcagcctgac atctgatgac tctgcggtct attattgtgc aagagcgatt 300
 acgacgacc cctttgactt ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

25 <210> 19
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

30 <400> 19
 atggttttca cacctcagat acttggactt atgctttttt ggatttcagc ctccagaggt 60
 gatattgtgc taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagcgtcagt 120
 ctttctctgca gggccagcca gagtattagc aacaacctac actggtatca acaaaaatca 180
 catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc 240
 aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcaactctca gtatcaacag tgtggagact 300

ES 2 573 642 T3

gaagatTTTg gagtGtattt ctgtcaacag agtaacacct ggccgtacac gttcggaggg 360
 gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caactttac 480
 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540
 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 600
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660
 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag 705

<210> 20
 <211> 948
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 20
 ctcagggaaa gctcgaagat ggTTTTcaca cctcagatac ttggacttat gctTTTTTgg 60
 atttcagcct ccagaggtga tattgtgcta actcagtctc cagccaccct gtctgtgact 120
 ccaggagata gcgctcagtct ttctctcagg gccagccaga gtattagcaa caacctacac 180
 tggatcaac aaaaatcaca tgagtctcca aggcttctca tcaagtatgc ttcccagtcc 240
 atctctggga tcccctccag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt caotctcagt 300
 atcaacagtg tggagactga agatTTTgga gtgtatttct gtcaacagag taacacctgg 360
 ccgtacacgt tgggagggg gaccaagctg gaaataaac gggctgatgc tgcaccaact 420
 gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg gaggtgcctc agtcgtgtgc 480
 ttcttgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaagt ggaagattga tggcagtgaa 540
 cgacaaaatg gcgctctgaa cagttggact gatcaggaca gcaaagacag cacctacagc 600
 atgagcagca cctcaccgtt gaccaaggac gagtatgaac gacataacag ctatacctgt 660
 gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga gttcaacag gaatgagtgt 720
 tagagacaaa ggtcctgaga cgccaccacc agctccccag ctccatccta tcttcccttc 780
 taaggctctg gaggcttccc cacaagcgac ctaccactgt tgcggtgctc caaacctcct 840
 cccacctcc ttctctcct cctcccttc cttggctttt atcatgctaa tatttgaga 900
 aatatTcaa taaagtgagt ctttgcaactt gaaaaaaaa aaaaaaaa 948

10

<210> 21
 <211> 1386
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<400> 21
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtatcaacag ctacaggtgt ccactcccag 60
 gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctt gtgaagcctg gggcttcatt gaagctgtcc 120

ES 2 573 642 T3

tgcaagtctt	ccgggtacac	cttcaccagc	tactggatgc	actgggtgag	gcagaggcct	180
ggacatggcc	ttgagtggat	cggagagatt	gatccttctg	acagttataa	agactacaat	240
cagaagttca	aggacaaggc	cacattgact	gtggacagat	cctccaacac	agcctacatg	300
cacctcagca	gcctgacatc	tgatgactct	gcggctctatt	attgtgcaag	agcgattacg	360
acgacccccct	ttgacttctg	gggccaaaggc	accactctca	cagtctcctc	agccaaaacg	420
acaacccccat	ctgtctatcc	actggcccct	ggatctgctg	ccaaaactaa	ctccatgggtg	480
accctgggat	gcctgggtcaa	gggctatttc	cctgagccag	tgacagtgac	ctggaactct	540
ggatccctgt	ccagcgggtgt	gcacaccttc	ccagctgtcc	tgacagtctga	cctctacact	600
ctgagcagct	cagtgactgt	cccctccagc	acctggccca	gcgagaccgt	cacctgcaac	660
gttgcccacc	eggccagcag	caccaagggtg	gacaagaaaa	ttgtgccag	ggattgtgggt	720
tgtaagcctt	gcatatgtac	agtcccagaa	gtatcatctg	tcttcatctt	cccccaag	780
cccaaggatg	tgctcaccat	tactctgact	cctaagggtca	cgtgtgttgt	ggtagacatc	840
agcaaggatg	atcccagaggt	ccagttcagc	tggtttgtag	atgatgtgga	ggtgcacaca	900
gctcagacgc	aaccccggga	ggagcagttc	aacagcactt	tccgctcagt	cagtgaactt	960
cccatcatgc	accaggactg	gctcaatggc	aaggagttca	aatgcagggt	caacagtgca	1020
gctttccctg	ccccatoga	gaaaaccatc	tccaaaacca	aaggcagacc	gaaggctoca	1080
caggtgtaca	ccattccacc	tccaaggag	cagatggcca	aggataaagt	cagtctgacc	1140
tgcatgataa	cagacttctt	cctgaagac	attactgtgg	agtggcagtg	gaatgggcag	1200
ccagcggaga	actacaagaa	cactcagccc	atcatggaca	cagatggctc	ttacttcgtc	1260
tacagcaagc	tcaatgtgca	gaagagcaac	tgggaggcag	gaaatacttt	cacctgctct	1320
gtgttacatg	agggcctgca	caaccaccat	actgagaaga	gcctctccca	ctctcctggt	1380
aatga						1386

<210> 22
 <211> 1593
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 22	gttcgttatc	ggaattaacc	agacaaatcg	ctccaccaac	taagaacggc	cctgttctct	60
	ctacagttac	tgagcacaca	ggacctcacc	atgggatgga	gctgtatcat	cctcttcttg	120
	gtatcaacag	ctacaggtgt	ccactcccag	gtccaactgc	agcagcctgg	ggctgagctt	180
	gtqaagcctg	ggccttcatt	gaagctgtcc	tgcaagtctt	ccgggtacac	cttcaccagc	240
	tactggatgc	actgggtgag	gcagaggcct	ggacatggcc	ttgagtggat	cggagagatt	300
	gatccttctg	acagttataa	agactacaat	cagaagttca	aggacaaggc	cacattgact	360
	gtggacagat	cctccaacac	agcctacatg	cacctcagca	gcctgacatc	tgatgactct	420

```

gcggtctatt attgtgcaag agcgattacg acgacccccct ttgacttctg gggccaaggc      480
accactctca cagtctcctc agccaaaacg acacccccat ctgtctatcc actggcccct      540
ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg accctgggat gcctgggtcaa gggctatttc      600
cctgagccag tgacagtgac ctggaactct ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc      660
ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc      720
acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac gttgccacc cggccagcag caccaaggtg      780
gacaagaaaa ttgtgccag ggattgtggt tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa      840
gtatcatctg tcttcatctt cccccaaaag cccaaggatg tgctcaccat tactctgact      900
cctaagggtc cgtgtgttgt ggtagacatc agcaaggatg atcccagagt ccagttcagc      960
tggtttgtag atgatgtgga ggtgcacaca gctcagacgc aaccccggga ggagcagttc     1020
aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt cccatcatgc accaggactg gctcaatggc     1080
aaggagttca aatgcagggt caacagtgca gctttccctg ccccatcga gaaaaccatc     1140
tccaaaacca aaggcagacc gaaggtcca caggtgtaca ccattccacc tccaaggag      1200
cagatggcca aggataaagt cagtctgacc tgcatgataa cagacttctt ccctgaagac     1260
attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag ccagcggaga actacaagaa cactcagccc     1320
atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac     1380
tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct gtgttacatg agggcctgca caaccacat      1440
actgagaaga gcctctcca ctctcctggt aaatgatccc agtgtccttg gagccctctg     1500
gtcctacagg actctgacac ctacctccac ccctccctgt ataaataaag caccacgac      1560
tgccttgga ccctgcaaaa aaaaaaaaaa aaa                                  1593

```

<210> 23
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera kappa quimérica de 4G8

10

```

<400> 23
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
 1          5          10          15

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

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

Ile Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
 50          55          60

```

ES 2 573 642 T3

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

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

Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn
 100 105 110

Thr Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 24
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDS de la cadena ligera kappa quimérica de 4G8

<400> 24
 atggttttca cacctcagat acttggactt atgctttttt ggatttcagg tgetcgagga 60
 gatattgtgc taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagcgtcagt 120
 ctttcctgca gggccagcca gagtattagc aacaacctac actggtatca acaaaaatca 180
 catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatccccctcc 240
 aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcactctca gtatcaacag tgtggagact 300

ES 2 573 642 T3

gaagattttg gagtgtatatt ctgtcaacag agtaaacacct ggccgtacac gttcggaggg 360
 gggaccaagc tggaataaaa acggactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420
 totgatgagc agttgaaatc tggaactgcc totgttgtgt gcttctgaa taactttat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatacagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 25
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada gamma 1 de IgG quimérica de 4G8

<400> 25

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe Asp Phe Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

ES 2 573 642 T3

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

ES 2 573 642 T3

420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

<210> 26
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDS de la cadena pesada gamma 1 de IgG quimérica de 4G8

<400> 26

atgggatgga gctggatctt tctctttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctctcag	60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctt gtgaagcctg gggcttcatt gaagctgtcc	120
tgcaagtctt ccgggtacac cttcaccagc tactggatgc actgggtgag gcagaggcct	180
ggacatggcc ttgagtggat cggagagatt gatccttctg acagttataa agactacaat	240
cagaagttca aggacaaggc cacattgact gtggacagat cctccaacac agcctacatg	300
cacctcagca gcctgacatc tgatgactct gcggtctatt attgtgcaag agcgattacg	360
acgacccccct ttgacttctg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agcctccacc	420
aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	480
gccctgggct gtctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca	540
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac	600
tcctcagca gcggtgtgac cgtgccctcc agcagcttg gcacccagac ctacatctgc	660
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	720
gacaaaactc acacatgcc accgtgcca gcacctgaac tctgggggg cccgtcagtc	780
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	840
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtat	960
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	1020
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag	1140
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1260

ES 2 573 642 T3

gaaggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa atgataa 1407

<210> 27
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena pesada de SDIE 4G8

10

<400> 27
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe Asp Phe Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

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

ES 2 573 642 T3

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

<210> 28
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDS de la cadena pesada de SDIE 4G8

<400> 28

atgggatgga	gctggatctt	tctctttctc	ctgtcaggaa	ctgcaggtgt	cctctctcag	60
gtccaactgc	agcagcctgg	ggctgagctt	gtgaagcctg	gggettatt	gaagctgtcc	120
tgcaagtctt	ccgggtacac	cttcaccagc	tactggatgc	actgggtgag	gcagaggcct	180
ggacatggcc	ttgagtggat	cggagagatt	gatccttctg	acagttataa	agactacaat	240
cagaagttca	aggacaaggc	cacattgact	gtggacagat	cctccaacac	agcctacatg	300
cacctcagca	gcctgacatc	tgatgactct	goggtctatt	attgtgcaag	agcgattacg	360
acgaccccc	ttgacttctg	gggccaaggc	accaactctc	cagtctctc	agcctccacc	420
aagggcccat	cgtcttccc	cctggcacc	tctccaaga	gcacctctgg	gggcacagcg	480
gccctgggct	gtctggtaa	ggactacttc	cccgaaccgg	tgacgggtgc	gtggaactca	540
ggcgccctga	ccagcggcgt	gcacaccttc	coggtgtcc	tacagtctc	aggactctac	600
tccctcagca	gcgtggtgac	cgtgccctcc	agcagcttgg	gcacccagac	ctacatctgc	660
aacgtgaatc	acaagcccag	caacaccaag	gtggacaaga	aagttgagcc	caaactctgt	720
gacaaaactc	acacatgcc	accgtgccca	gcacctgaac	tctgggggg	cccggatgtc	780
ttctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	ccggacccc	tgaggtcaca	840
tgcgtggtgg	tggacgtgag	ccacgaagac	cctgaggtca	agttcaactg	gtacgtggac	900
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagtacaa	cagcacgtat	960
cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgctcctgac	caggactggc	tgaatggcaa	ggagtacaag	1020
tgcaaggtct	ccaacaaagc	cctcccagcc	cccgaggaga	aaaccatctc	caaagccaaa	1080
gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgccccat	cccgggatga	gctgaccaag	1140
aaccaggtca	gcctgacctg	cctgggtcaa	ggcttctatc	ccagcgacat	cgccgtggag	1200
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgctcccgt	gctggactcc	1260
gacggctcct	tcttctcta	cagcaagctc	accgtggaca	agagcaggtg	gcagcagggg	1320
aacgtcttct	catgctccgt	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	1380
ctctccctgt	ctccgggtaa	atgataa				1407

<210> 29

ES 2 573 642 T3

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Segmento VJ de VL de BV10

<400> 29

```

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
                20           25           30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Met Ala Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
          35           40           45

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

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

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

His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          100           105           110
  
```

Arg

10 <210> 30
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Segmento VDJ de VH de BV10

<400> 30

```

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
                20           25           30

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
          35           40           45
  
```

20

ES 2 573 642 T3

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

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Asn His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 31
<211> 240
<212> PRT
<213> Mus musculus

5

<400> 31
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Ile Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

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

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

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

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

Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe
130 135 140

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

ES 2 573 642 T3

Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile
 165 170 175

Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr
 195 200 205

Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His
 210 215 220

Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 32
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena pesada gamma 1 de IgG BV10 de ratón

10

<400> 32
 Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

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

Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 85 90 95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Asn His Tyr Tyr Ala
 115 120 125

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys

ES 2 573 642 T3

130						135										140
Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	
145					150					155					160	
Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	
			165					170						175		
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	
			180					185					190			
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	
		195					200					205				
Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	
	210					215					220					
Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	
225					230					235					240	
Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	
			245						250					255		
Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	
			260					265					270			
Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	
		275					280					285				
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	
	290					295					300					
Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	
305					310					315					320	
Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
				325					330					335		
Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
			340					345					350			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	
		355					360					365				
Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	
	370					375					380					
Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	
385					390					395					400	

ES 2 573 642 T3

Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile
 405 410 415

Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln
 420 425 430

Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His
 435 440 445

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

5 <210> 33
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDS del segmento VJ de VL de BV10

<400> 33
 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
 atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctatatggcc 120
 tggatatcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctacggggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaaccgattt cactcttacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga tcatagttat 300
 ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gg 342

15 <210> 34
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDS del segmento VDJ de VH de BV10

<400> 34
 caggtgcagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60
 acctgcacag tctctggttt ctcatctaac aactatgggt tacactgggt togccagtct 120
 ccaggaaagg gcctggagtg gctgggagtg atatggagtg gtggaagcac agactataat 180
 gcagctttca tatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt 240
 aaaatgaaca gtctgcaggc tgatgacaca gccatatact actgtgccag aaaaggaggy 300
 atctactatg ctaaccatta ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctgagtcacc 360
 gtctctca 369

25 <210> 35
 <211> 723
 <212> ADN

ES 2 573 642 T3

<213> Mus musculus

<400> 35

atggaatcac agactcaggt cctcatctcc ttgctgttct gggtatctgg tacctgtggg	60
gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaaggctact	120
atgagctgca agtccagtc gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctatatggcc	180
tggtatcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctacggggc atccactagg	240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaaccgattt cactcttacc	300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga tcatagttat	360
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gggctgatgc tgcaccaact	420
gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg gaggtgcctc agtcgtgtgc	480
ttcttgaaca acttctacc caaagacatc aatgtcaagt ggaagattga tggcagtgaa	540
cgacaaaatg ggcctctgaa cagttggact gatcaggaca gcaaagacag cacctacagc	600
atgagcagca cctcactgtt gaccaaggac gagtatgaac gacataacag ctatacctgt	660
gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga gcttcaacag gaatgagtgt	720
tag	723

5

<210> 36

<211> 907

<212> ADN

<213> Mus musculus

10

<400> 36

atggaatcac agactcaggt cctcatctcc ttgctgttct gggtatctgg tacctgtggg	60
gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaaggctact	120
atgagctgca agtccagtc gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctatatggcc	180
tggtatcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctacggggc atccactagg	240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaaccgattt cactcttacc	300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga tcatagttat	360
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gggctgatgc tgcaccaact	420
gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg gaggtgcctc agtcgtgtgc	480
ttcttgaaca acttctacc caaagacatc aatgtcaagt ggaagattga tggcagtgaa	540
cgacaaaatg ggcctctgaa cagttggact gatcaggaca gcaaagacag cacctacagc	600
atgagcagca cctcactgtt gaccaaggac gagtatgaac gacataacag ctatacctgt	660
gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga gcttcaacag gaatgagtgt	720
tagagacaaa ggcctctgaga cgcaccacc agtccccag ctccatccta tcttcccttc	780
taaggtcttg gaggtctccc cacaagcagc ctaccactgt tgcgggtgctc caaacctcct	840
ccccactcc ttctcctcct cctcccttcc cttggctttt atcatgctaa tatttgcattg	900
ataaaaa	907

ES 2 573 642 T3

<210> 37
 <211> 1401
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 37
 atggctgtct tggggtgct cttctgctg gtgacattcc caagctgtgt cctctcccag 60
 gtgcagctga agcagtcagg acctggccta gtgcagccct cacagagcct gtccatcacc 120
 tgcacagtct ctggtttctc attaactaac tatggtttac actgggttcg ccagtctcca 180
 ggaaagggcc tggagtggct gggagtgata tggagtggg gaagcacaga ctataatgca 240
 gctttcatat ccagactgag catcagcaag gacaactcca agagccaagt tttctttaa 300
 atgaacagtc tgcaggctga tgacacagcc atatactact gtgccagaaa aggagggatc 360
 tactatgcta accattacta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 420
 tcctcagcca aaacgacaac cccatctgtc tatccactgg cccctggatc tgctgccc aa 480
 actaactcca tggtgaccct gggatgctg gtcaagggct atttcctga gccagtgaca 540
 gtgacctgga actctggatc cctgtccagc ggtgtgcaca cottcccagc tgtcctggag 600
 tctgacctct acactctgag cagctcagtg actgtcccct ccagcctcgc gcccagcgag 660
 accgtcacct gcaacgttgc ccaccggcc agcagcacca aggtggacaa gaaaattgtg 720
 cccagggatt gtggttghaa gccttgcata tgtacagtcc cagaagtatc atctgtcttc 780
 atcttcccc caaagcccaa ggatgtgctc accattactc tgactoctaa ggtcacgtgt 840
 gttgtggtag acatcagcaa ggatgatccc gaggtccagt tcagctgggt tgtagatgat 900
 gtggaggtgc acacagctca gacgcaacct cgggaggagc agttcaacag cactttccgc 960
 tcagtcagtg aacttcccat catgcaccag gactggctca atggcaagga gttcaaatgc 1020
 aggtcaaca gtgcagcttt cctgcccc atcgagaaaa ccattctcaa aaccaaaggc 1080
 agaccgaagg ctccacaggt gtacaccatt ccacctcca aggagcagat ggccaaggat 1140
 aaagtcagtc tgacctgcat gataacagac ttcttcctg aagacattac tgtggagtgg 1200
 cagtggaatg ggcagccagc ggagaactac aagaacctc agccatcat gaacacgaat 1260
 ggctcttact tcgtctacag caagctcaat gtgcagaaga gcaactggga ggcaggaaat 1320
 actttcacct gctctgtgtt acatgagggc ctgcacaacc accatactga gaagagcctc 1380
 tcccactctc ctggtaaatg a 1401

10 <210> 38
 <211> 1563
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <400> 38

ES 2 573 642 T3

cctccatcag agcatggctg tottggggct gctcttctgc ctggtgacat tccaagctg 60
 tgtcctctcc caggtgcagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag 120
 cctgtccatc acctgcacag tctctggttt ctcatctaac aactatgggt tacactgggt 180
 togccagtct ccaggaaagg gcctggagtg gctgggagtg atatggagtg gtggaagcac 240
 agactataat gcagctttca tatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca 300
 aqttttcttt aaaatgaaca gtctgcagcc tgatgcacaca gccatatact actgtgccag 360
 aaaaggaggg atctactatg ctaaccatta ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac 420
 ctcagtcacc gtctcctcag ccaaaaacgac acccccatct gtctatccac tggcccctgg 480
 atctgctgcc caaactaact ccattggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc 540
 tgagccagtg acagtgcact ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtc acaccttccc 600
 agctgtcctg gagtctgacc tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagccc 660
 tcggcccagc gagaccgtca cctgcaacgt tgcccacccg gccagcagca ccaaggtgga 720
 caagaaaatt gtgcccaggg attgtggttg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt 780
 atcatctgtc ttcacttccc ccccaaagcc caaggatgtg ctaccatta ctctgactcc 840
 taaggtcacg tgtgtgtggt tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg 900
 gttttagat gatgtggagg tgcacacagc tcagacgcaa ccccgaggag agcagttcaa 960
 cagcactttc cgctcagtca gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa 1020
 ggagttcaaa tgcagggtca acagtgcagc tttccctgcc cccatogaga aaacctctc 1080
 caaaacaaa ggcagaccga aggctccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca 1140
 gatggccaag gataaagtca gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat 1200
 tactgtggag tggcagtgga atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctgagccat 1260
 catgaacacg aatggctctt acttctgtct cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg 1320
 ggaggcagga aatactttca cctgctctgt gttacatgag ggccctgcaca accaccatac 1380
 tgagaagagc ctctcccact ctctctgtaa atgatcccag tgtccttggg gccctctggt 1440
 cctacaggac tctgacacct acctccacce ctccctgtat aaataaagca cccagcactg 1500
 ccttgggacc ctgaaaaaaaa aaagaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560
 aaa 1563

<210> 39
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera kappa quimérica de BV10

10

<400> 39

ES 2 573 642 T3

Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
 1 5 10 15

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

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

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

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

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

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

Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

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

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 40
 <211> 723
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

ES 2 573 642 T3

<220>

<223> CDS de la cadena kappa quimérica de BV10

5 <400> 40
 atggttttca cacctcagat acttggactt atgctttttt ggatttcagg tgctcgagga 60
 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaaggctcact 120
 atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctatatggcc 180
 tggatcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctacggggc atccactagg 240
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaaccgattt cactcttacc 300
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga tcatagttat 360
 ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac ggactgtggc tgcaccatct 420
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
 ctcagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
 tag 723

<210> 41

<211> 472

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada gamma 1 IgG quimérica BV10

15

<400> 41

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

ES 2 573 642 T3

Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
85 90 95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Asn His Tyr Tyr Ala
115 120 125

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
225 230 235 240

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
245 250 255

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
275 280 285

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
305 310 315 320

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
325 330 335

ES 2 573 642 T3

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
340 345 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
405 410 415

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

- <210> 42
- <211> 1422
- <212> ADN
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> CDS de la cadena pesada gamma 1 de IgG quimérica de BV10

10

<400> 42
atgggatgga gctggatcct tctctttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctcccag 60
gtgcagctga agcagtcagg acctggccta gtgcagcct cacagagcct gtccatcacc 120
tgcacagtct ctggtttctc attaactaac tatggtttac actgggttcg ccagtctcca 180
ggaaagggcc tggagtggct gggagtgata tggagtggg gaagcacaga ctataatgca 240
gctttcatat ccagactgag catcagcaag gacaactoca agagccaagt tttctttaa 300
atgaacagtc tgcaggctga tgacacagcc atatactact gtgccagaaa aggagggatc 360
tactatgcta accattacta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 420
tcctcagcct ccaccaagg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 480
tctgggggca cagcggcct gggctgtctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag 600

ES 2 573 642 T3

```

tctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt 720
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 780
gggggcccgt cagtcttct cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 840
accctgagg tcacatgctt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 960
tacaacagca cgtatcgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1080
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg 1140
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct 1260
cccgctgctg actcogacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1320
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380
tacacgcaga agagcctctc cctgtctcgg ggtaaatgat aa 1422

```

5 <210> 43
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cadena pesada de SDIE BV10

10 <400> 43

```

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1           5           10           15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
20           25           30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
35           40           45

Thr Asn Tyr Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
50           55           60

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

Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
85           90           95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr

```


ES 2 573 642 T3

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 44
 <211> 1422
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> CDS de la cadena pesada de SDIE BV10

10

<400> 44
 atgggatgga gctggatctt tctctttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctcccag 60
 gtgcagctga agcagtcagg acctggccta gtgcagccct cacagagcct gtccatcacc 120
 tgcacagtct ctggtttctc attaactaac tatggtttac actgggttcg ccagtctcca 180
 ggaaagggcc tggagtggct gggagtgata tggagtgggtg gaagcacaga ctataatgca 240
 gctttcatat ccagactgag catcagcaag gacaactcca agagccaagt tttctttaa 300
 atgaacagtc tgcaggctga tgacacagcc atatactact gtgccagaaa aggagggatc 360
 tactatgcta accattacta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 420
 tctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 480
 tctgggggca cagcggccct gggctgtctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccgc tgctctacag 600
 tctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 780

ES 2 573 642 T3

gggggcccg atgtcttct cttccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccg 840
 acccctgagg tcacatgct ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc 900
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 960
 tacaacagca cgtatcgtgt ggtcagcgtc ctcacctcc tgcaccagga ctggtgaat 1020
 ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac aaagcctcc cagccccga ggagaaaacc 1080
 atctccaaag ccaaagggca gccccagaa ccacaggtgt acacctgac cccatcccg 1140
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200
 gacatgcgag tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgctt 1260
 cccgtgctgg actcogacgg ctccttctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1320
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctcog ggtaaagtat aa 1422

5 <210> 45
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico gamma1-for

<400> 45
 caaggcttac aaccacaatc cctgg 25

15 <210> 46
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico gamma1-back

<400> 46
 catatgtaca gtcccagaag tatcatctg 29

25 <210> 47
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ck-for

<400> 47
 tgttcaagaa gcacacgact gaggcacctc c 31

35 <210> 48
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico ck-back

45 <400> 48
 acttctaccc caaagacatc aatgtcaag 29

5	<210> 49 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico k-for1	
10	<400> 49 cctggtgaag ctcttgacaa tggg	24
15	<210> 50 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico k-for2	
20	<400> 50 atgtcttgtg agtggcctca cagg	24
25	<210> 51 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico CG1-for1	
30	<400> 51 cgtctacagc aagctcaatg tgc	23
35	<210> 52 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico CG1-for2	
40	<400> 52 ccatctgtct atccactggc c	21
45	<210> 53 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico CG1-rev1	
50	<400> 53 ccaggtcact gtcactggct cag	23
55	<210> 54 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador oligonucleotídico CG1-rev2	
60	<400> 54	

	cctcatgtaa cacagagcag g	21
	<210> 55 <211> 53	
5	<212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico 4G8-H-for	
10	<400> 55 tctcttcaca ggtgtcctct ctcaggtcca actgcagcag cctggggctg agc	53
	<210> 56 <211> 52	
15	<212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico 4G8-H-rev	
20	<400> 56 gagaaggtag gactcacctg aggagactgt gagagtggg ccttggcccc ag	52
	<210> 57 <211> 60	
25	<212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico BV10-H-for	
	<400> 57 agaggtccac tetgtctttc tcttcacagg tgtctctcc caggtgcagc tgaagcagtc	60
35	<210> 58 <211> 49	
	<212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador oligonucleotídico BV10-H-rev	
	<400> 58 gagaaggtag gactcacctg aggagacggt gactgaggtt ccttgacct	49
45	<210> 59 <211> 40	
	<212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador oligonucleotídico universal for (AatII)	
	<400> 59 agaggtccac tetgtctttc tcttcacagg tgtctctcc	40
55	<210> 60 <211> 33	
60	<212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico universal rev (ClaI)	

	<400> 60		
	tatcgattta gaatgggaga aggtaggact cac		33
5	<210> 61 <211> 42 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> Cebador oligonucleotídico 4G8-L-for (XhoI)		
	<400> 61		
15	actcgaggag atattgtgct aactcagtct ccagccaccc tg		42
	<210> 62 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> Cebador oligonucleotídico 4G8-L-rev (SpeI)		
	<400> 62		
25	tactagtact tacgttttat ttccagcttg gtccccctcc c		41
	<210> 63 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> Cebador oligonucleotídico BV10-L-for (XhoI)		
	<400> 63		
35	actcgaggag acattgtgat gacacagtct ccatcctccc		40
	<210> 64 <211> 47 <212> ADN <213> Artificial		
40	<220> <223> Cebador oligonucleotídico BV10-L-rev (SpeI)		
	<400> 64		
45	actagtactt acgtttcagc tccagcttgg tcccagcacc gaacgtg		47
	<210> 65 <211> 952 <212> PRT <213> Homo sapiens		
50	<400> 65		

ES 2 573 642 T3

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

Phe Ser Ala Met Ile Phe Gly Thr Ile Thr Asn Gln Asp Leu Pro Val
20 25 30

Ile Lys Cys Val Leu Ile Asn His Lys Asn Asn Asp Ser Ser Val Gly
35 40 45

Lys Ser Ser Ser Tyr Pro Met Val Ser Glu Ser Pro Glu Asp Leu Gly
50 55 60

Cys Ala Leu Arg Pro Gln Asn Ser Gly Thr Val Tyr Glu Ala Ala Ala
65 70 75 80

Val Glu Val Asp Val Ser Ala Ser Ile Thr Leu Gln Val Leu Val Asp
85 90 95

Ala Pro Gly Asn Ile Ser Cys Leu Trp Val Phe Lys His Ser Ser Leu
100 105 110

Asn Cys Gln Pro His Phe Asp Leu Gln Asn Arg Gly Val Val Ser Met
115 120 125

Val Ile Leu Lys Met Thr Glu Thr Gln Ala Gly Glu Tyr Leu Leu Phe
130 135 140

Ile Gln Ser Glu Ala Thr Asn Tyr Thr Ile Leu Phe Thr Val Ser Ile
145 150 155 160

Arg Asn Thr Leu Leu Tyr Thr Leu Arg Arg Pro Tyr Phe Arg Lys Met
165 170 175

Glu Asn Gln Asp Ala Leu Val Cys Ile Ser Glu Ser Val Pro Glu Pro
180 185 190

Ile Val Glu Trp Val Leu Cys Asp Ser Gln Gly Glu Ser Cys Lys Glu
195 200 205

Glu Ser Pro Ala Val Val Lys Lys Glu Glu Lys Val Leu His Glu Leu
210 215 220

ES 2 573 642 T3

Phe Gly Met Asp Ile Arg Cys Cys Ala Arg Asn Glu Leu Gly Arg Glu
 225 230 235 240
 Cys Thr Arg Leu Phe Thr Ile Asp Leu Asn Gln Thr Pro Gln Thr Thr
 245 250 255
 Leu Pro Gln Leu Phe Leu Lys Val Gly Glu Pro Leu Trp Ile Arg Cys
 260 265 270
 Lys Ala Val His Val Asn His Gly Phe Gly Leu Thr Trp Glu Leu Glu
 275 280 285
 Asn Lys Ala Leu Glu Glu Gly Asn Tyr Phe Glu Met Ser Thr Tyr Ser
 290 295 300
 Thr Asn Arg Thr Met Ile Arg Ile Leu Phe Ala Phe Val Ser Ser Val
 305 310 315 320
 Ala Arg Asn Asp Thr Gly Tyr Tyr Thr Cys Ser Ser Ser Lys His Pro
 325 330 335
 Ser Gln Ser Ala Leu Val Thr Ile Val Glu Lys Gly Phe Ile Asn Ala
 340 345 350
 Thr Asn Ser Ser Glu Asp Tyr Glu Ile Asp Gln Tyr Glu Glu Phe Cys
 355 360 365
 Phe Ser Val Arg Phe Lys Ala Tyr Pro Gln Ile Arg Cys Thr Trp Thr
 370 375 380
 Phe Ser Arg Lys Ser Phe Pro Cys Glu Gln Lys Gly Leu Asp Asn Gly
 385 390 395 400
 Tyr Ser Ile Ser Lys Phe Cys Asn His Lys His Gln Pro Gly Glu Tyr
 405 410 415
 Ile Phe His Ala Glu Asn Asp Asp Ala Gln Phe Thr Lys Met Phe Thr
 420 425 430
 Leu Asn Ile Arg Arg Lys Pro Gln Val Leu Ala Glu Ala Ser Ala Ser
 435 440 445
 Gln Ala Ser Cys Phe Ser Asp Gly Tyr Pro Leu Pro Ser Trp Thr Trp
 450 455 460
 Lys Lys Cys Ser Asp Lys Ser Pro Asn Cys Thr Glu Glu Ile Thr Glu
 465 470 475 480

ES 2 573 642 T3

Gly Val Trp Asn Arg Lys Ala Asn Arg Lys Val Phe Gly Gln Trp Val
 485 490 495

Ser Ser Ser Thr Leu Asn Met Ser Glu Ala Ile Lys Gly Phe Leu Val
 500 505 510

Lys Cys Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Gly Thr Ser Cys Glu Thr Ile Leu
 515 520 525

Leu Asn Ser Pro Gly Pro Phe Pro Phe Ile Gln Asp Asn Ile Ser Phe
 530 535 540

Tyr Ala Thr Ile Gly Val Cys Leu Leu Phe Ile Val Val Leu Thr Leu
 545 550 555 560

Leu Ile Cys His Lys Tyr Lys Lys Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu
 565 570 575

Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val
 580 585 590

Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu
 595 600 605

Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val
 610 615 620

Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile Gln
 625 630 635 640

Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Lys Ala Asp Ser Ser Glu Arg Glu
 645 650 655

Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Met Met Thr Gln Leu Gly Ser His Glu
 660 665 670

Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Leu Ser Gly Pro Ile Tyr
 675 680 685

Leu Ile Phe Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Tyr Leu Arg
 690 695 700

Ser Lys Arg Glu Lys Phe His Arg Thr Trp Thr Glu Ile Phe Lys Glu
 705 710 715 720

His Asn Phe Ser Phe Tyr Pro Thr Phe Gln Ser His Pro Asn Ser Ser
 725 730 735

Met Pro Gly Ser Arg Glu Val Gln Ile His Pro Asp Ser Asp Gln Ile

ES 2 573 642 T3

	740		745		750														
Ser	Gly	Leu	His	Gly	Asn	Ser	Phe	His	Ser	Glu	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr				
		755					760					765							
Glu	Asn	Gln	Lys	Arg	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Val	Leu	Thr				
	770					775					780								
Phe	Glu	Asp	Leu	Leu	Cys	Phe	Ala	Tyr	Gln	Val	Ala	Lys	Gly	Met	Glu				
785					790					795					800				
Phe	Leu	Glu	Phe	Lys	Ser	Ala	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro				
				805					810					815					
Glu	Ser	Leu	Phe	Glu	Gly	Ile	Tyr	Thr	Ile	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser				
			820					825					830						
Tyr	Gly	Ile	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Val	Asn	Pro	Tyr				
		835					840					845							
Pro	Gly	Ile	Pro	Val	Asp	Ala	Asn	Phe	Tyr	Lys	Leu	Ile	Gln	Asn	Gly				
	850					855					860								
Phe	Lys	Met	Asp	Gln	Pro	Phe	Tyr	Ala	Thr	Glu	Glu	Ile	Tyr	Ile	Ile				
865					870					875					880				
Met	Gln	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Asp	Ser	Arg	Lys	Arg	Pro	Ser	Phe	Pro				
				885					890					895					
Asn	Leu	Thr	Ser	Phe	Leu	Gly	Cys	Gln	Leu	Ala	Asp	Ala	Glu	Glu	Ala				
			900					905					910						
Met	Tyr	Gln	Asn	Val	Asp	Gly	Arg	Val	Ser	Glu	Cys	Pro	His	Thr	Tyr				
		915					920					925							
Gln	Asn	Arg	Arg	Pro	Phe	Ser	Arg	Glu	Met	Asp	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser				
	930					935					940								
Pro	Gln	Ala	Gln	Val	Glu	Asp	Ser												
945					950														

<210> 66

<211> 24

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Etiqueta M; aminoácidos #455-466 de la pieza de la cola de Ig alfa 1 humana y epítipo c-myc

10

<400> 66

ES 2 573 642 T3

Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Glu Gln Lys Leu
1 5 10 15

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Arg
 20

5 <210> 67
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> aminoácidos 455-466 de la pieza de la cola de Ig alfa 1 humana

<400> 67
Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu
1 5 10

15 <210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> epítipo c-myc

<400> 68
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Arg
1 5 10

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo IgG que se une al receptor tirosina quinasa humano FLT3, dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera y una sustitución de aminoácidos en la región constante relativo a un anticuerpo anti-FLT3 progenitor, en donde dicha sustitución de aminoácidos comprende las sustituciones de aminoácidos S239D e I332E, en donde la numeración posicional es según el índice EU.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la CDR1 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; la CDR2 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2; la CDR3 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3; la CDR1 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4; la CDR2 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5; la CDR3 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la CDR1 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7; la CDR2 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8; la CDR3 de V_L comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9; la CDR1 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10; la CDR2 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11; la CDR3 de V_H comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
4. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde la cadena pesada comprende un dominio V_H que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14 y la cadena ligera comprende un dominio V_L que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13.
5. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde la cadena pesada comprende un dominio V_H que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30 y la cadena ligera comprende un dominio V_L que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico y comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico y comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 y/o una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 39.
8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho anticuerpo se une con afinidad aumentada al receptor FcγR1IIa o tiene función efectora ADCC aumentada comparado con el anticuerpo progenitor.
9. Una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y ligera del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para uso en un método de tratar un linfoma o leucemia en un mamífero.
11. El anticuerpo para uso de la reivindicación 10, en donde el linfoma o leucemia está en un estadio de enfermedad residual mínima (ERM).
12. El anticuerpo para uso según la reivindicación 10 o 11, en donde el linfoma o leucemia se selecciona del grupo que consiste en: linfoma no hodgkiniano (LNH), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células B (B-LLA), linfoma de células del manto (LCM), leucemia de células pilosas (LCP), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA), y mieloma múltiple (MM).
13. El anticuerpo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde dicho anticuerpo se administra en combinación con al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal, un inhibidor de quinasa, un agente antiangiogénico, un cardioprotector, un agente inmunostimulador, un agente inmunosupresor, un inhibidor de angiogénesis, un inhibidor de proteína tirosina quinasa, y un segundo anticuerpo.
14. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un soporte farmacéuticamente aceptable.

15. Línea celular transfectada que produce un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

Figura 1

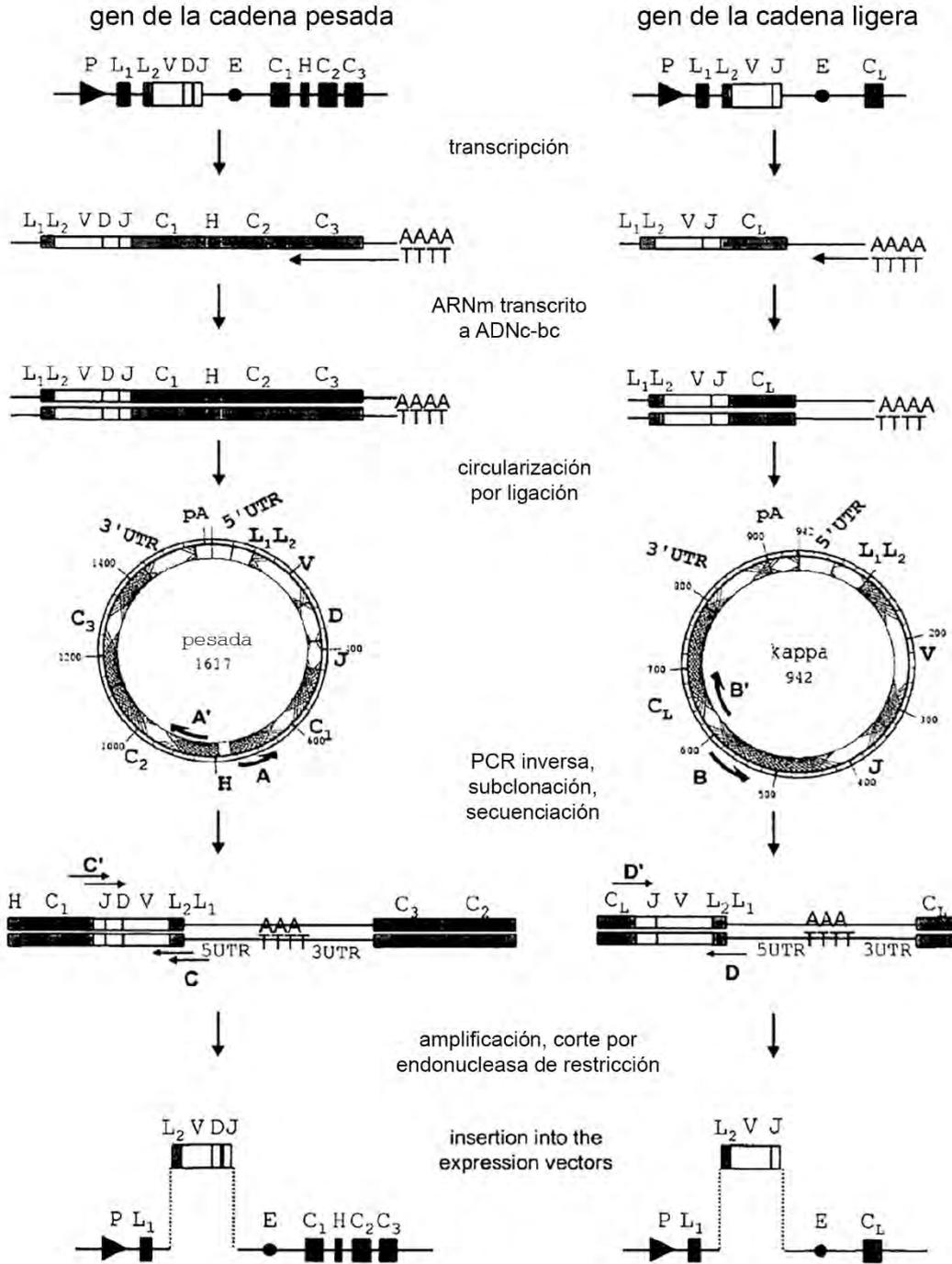
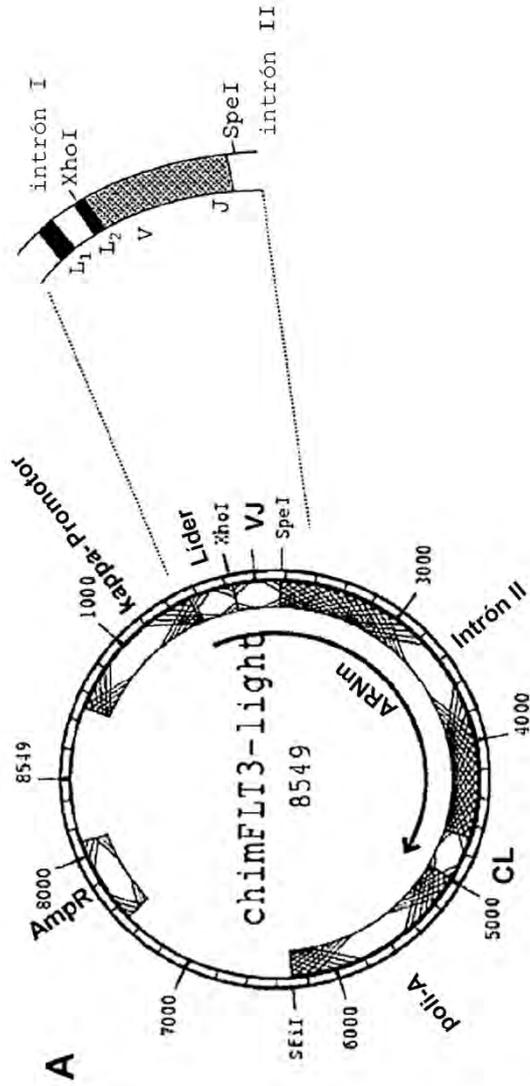


Figura 2 Vector para la expresión de la cadena kappa quimérica de anticuerpos específicos anti-FLT3 en células linfoides



B

ATG GTT TTC ACA CCT CAG ATA CTT GGA CTT ATG CTT TTT TGG ATT TCA G] gtagctgctgtt.....intron I...
 Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser G
 -20

XhoI
 SpeI
 ..ttttccag[GT GCT CGA GGA|GA.....exón VJ (amplificado por iPCR).....AAA C] gtaagtaactagtgtttt...intron II.....
 Ly Ala Arg Gly Asp
 +1
 Lys A

Figura 3 Vector para la expresión de cadena pesada ($\gamma 1$) quimérica de anticuerpos específicos anti-FLT3 en células linfoides

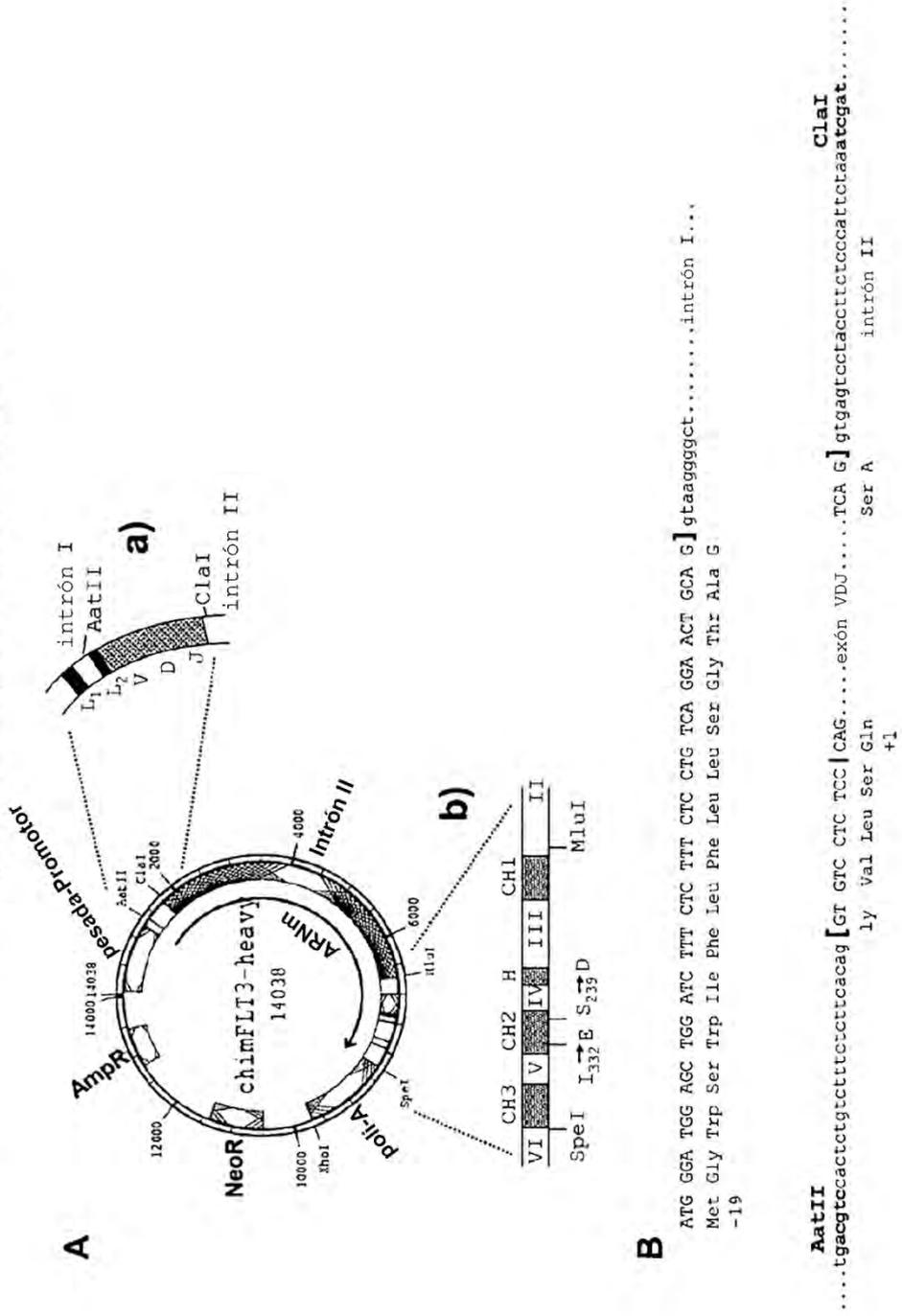


Figura 4

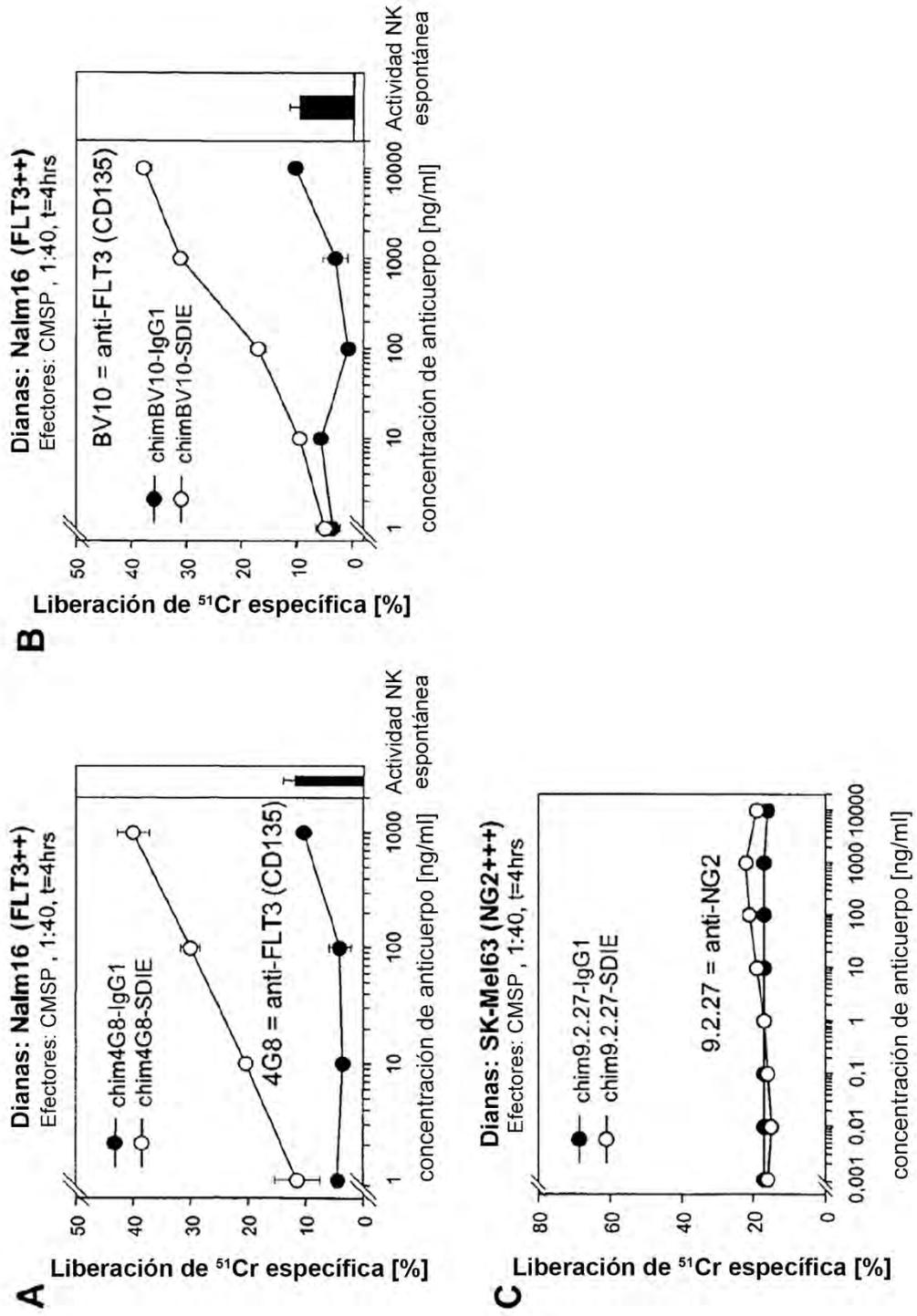
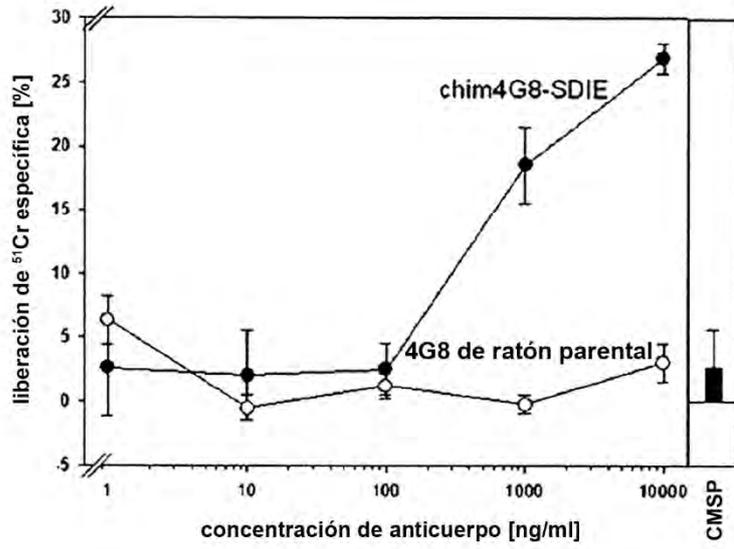


Figura 5



Células diana: LMA SG3:
 E:D = 50:1
 T = 20 hrs

Figura 7

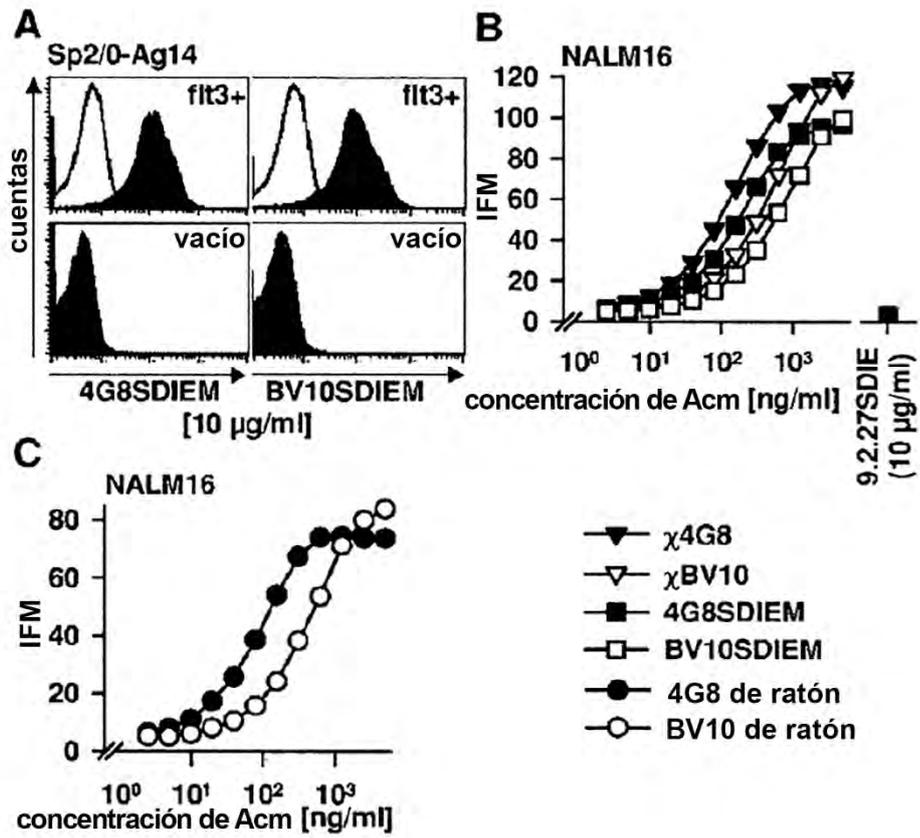


Figura 8

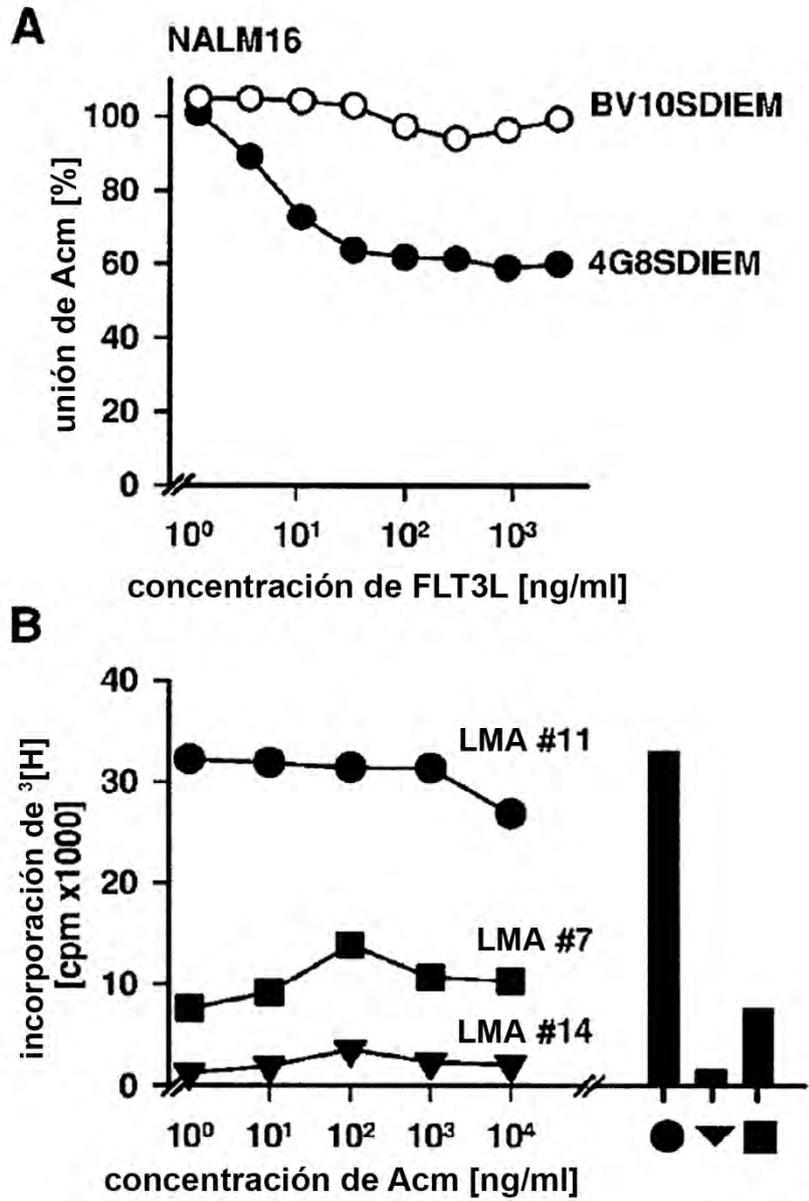


Figura 9

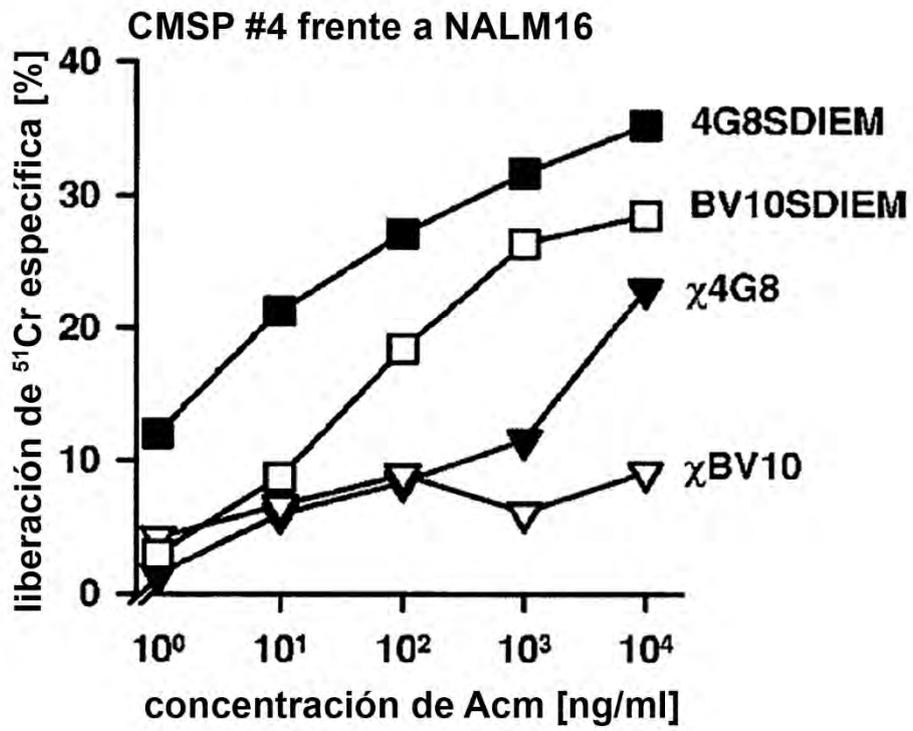


Figura 10

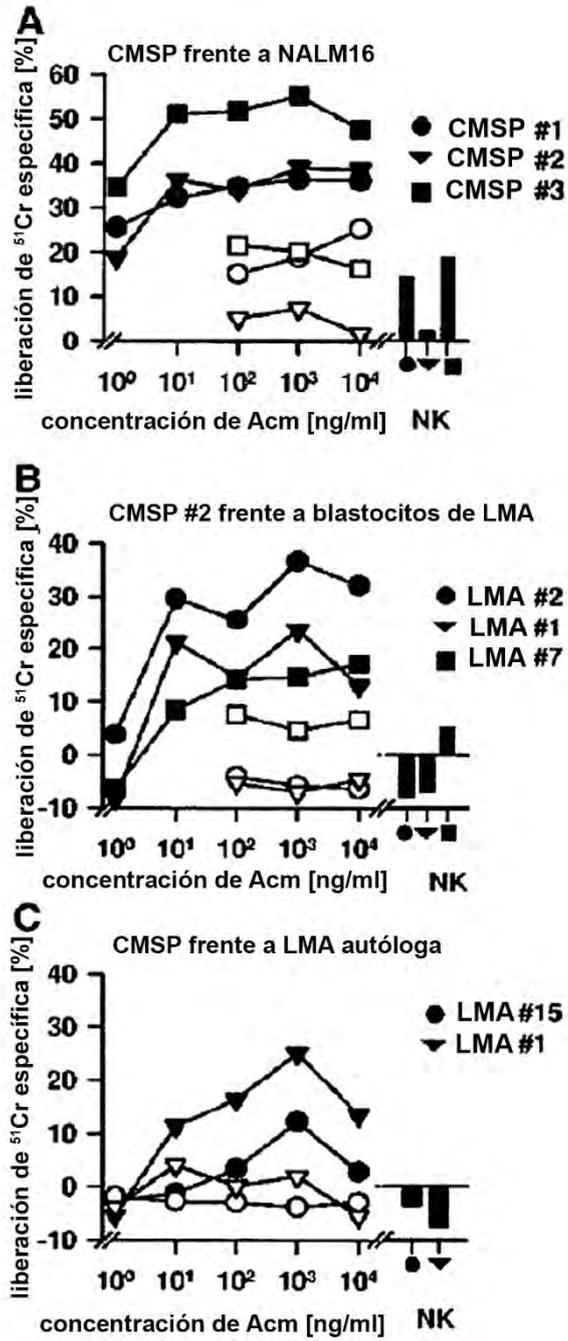


Figura 11

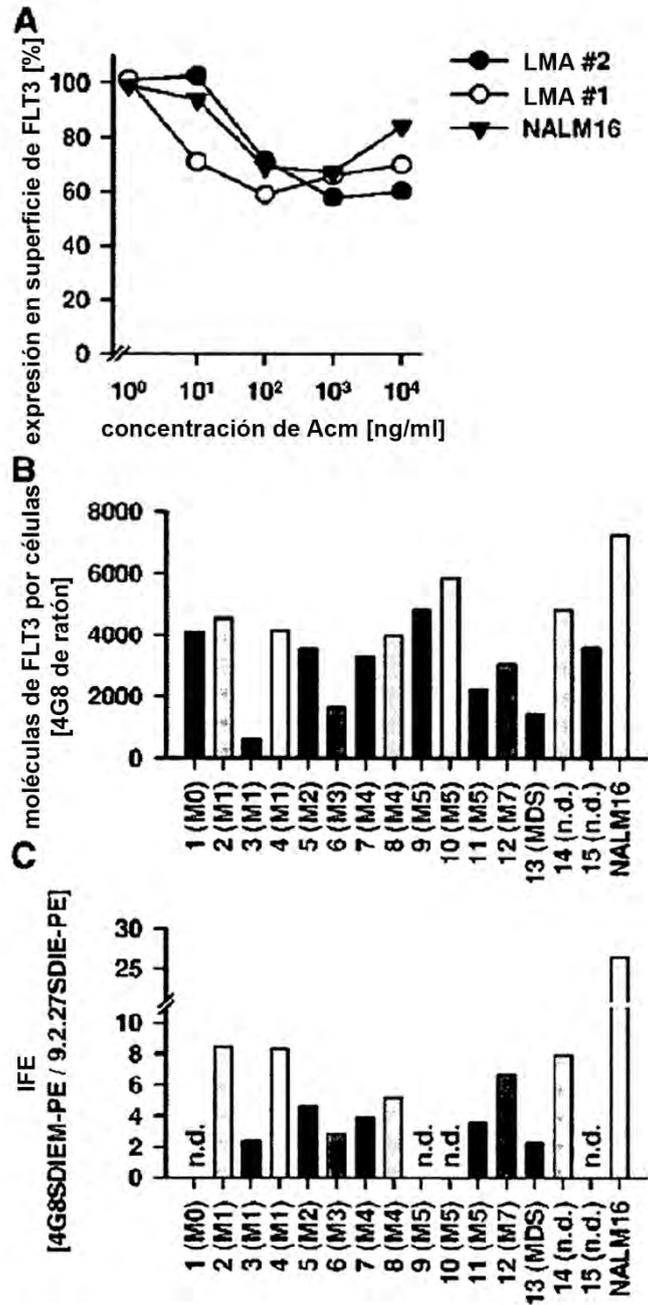


Figura 12

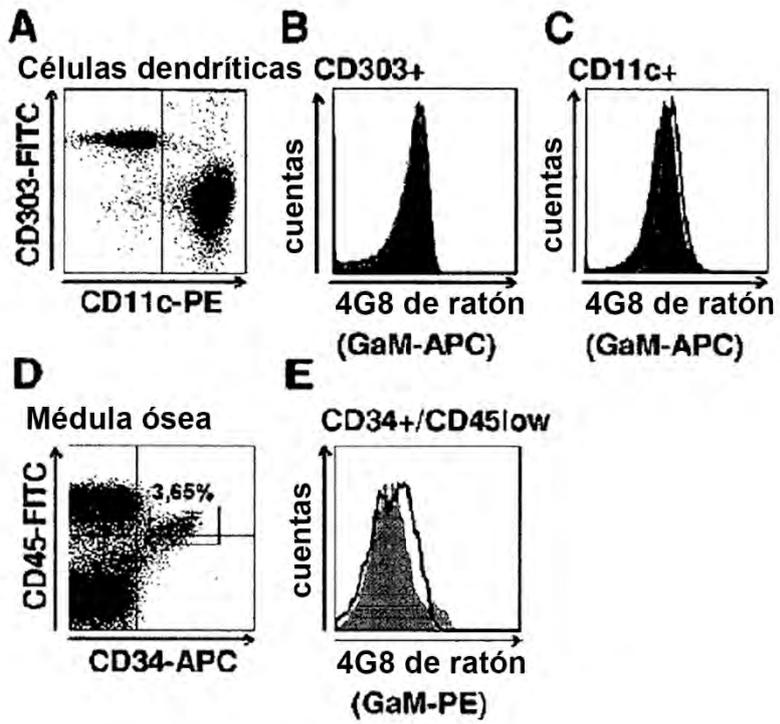


Figura 13

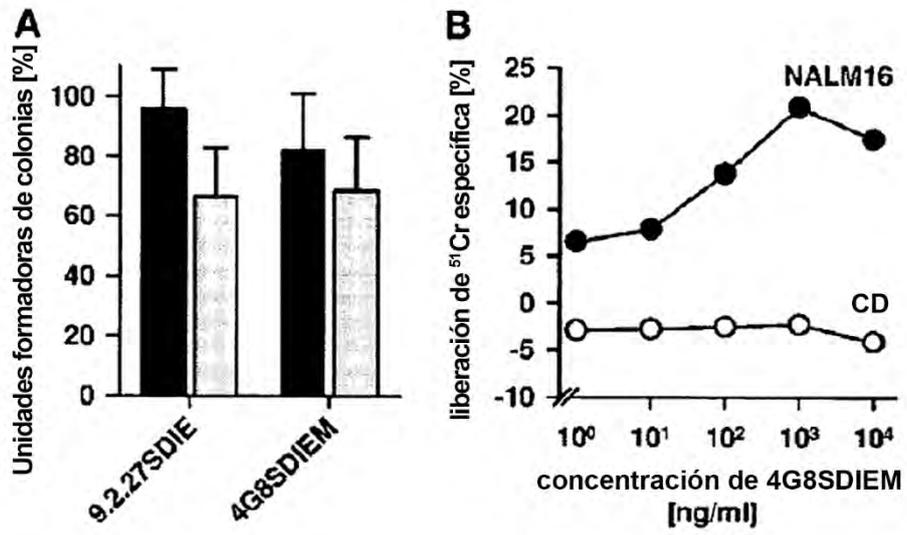


Figura 14

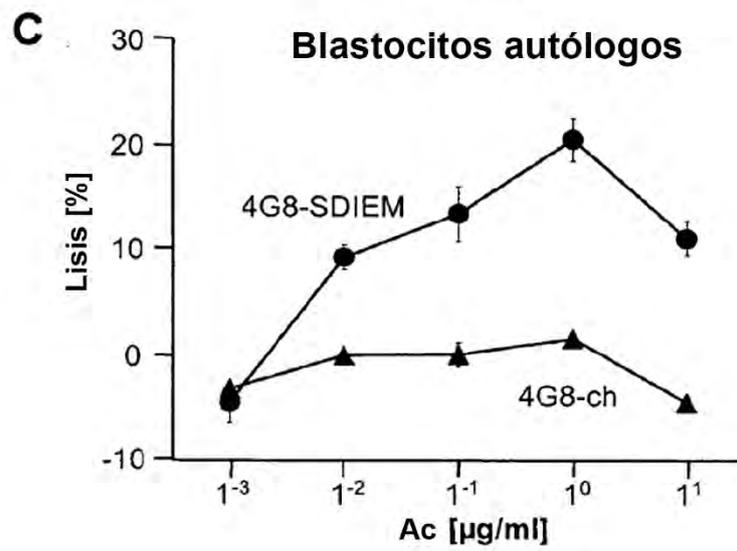
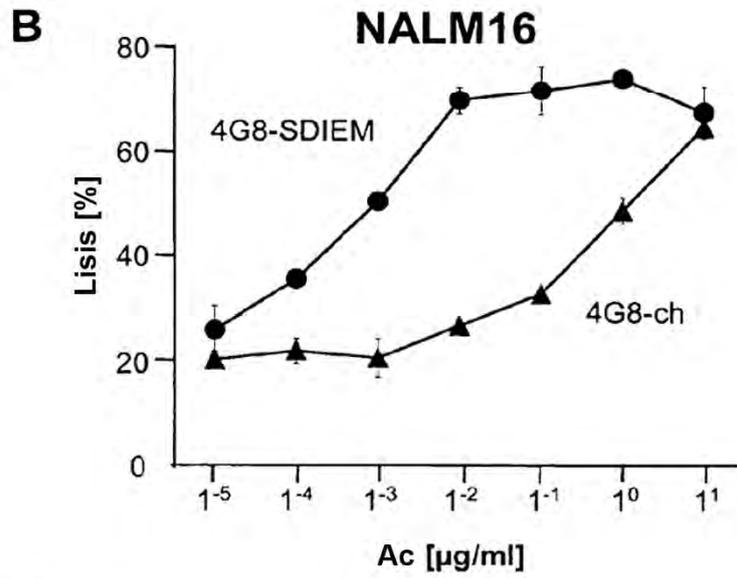
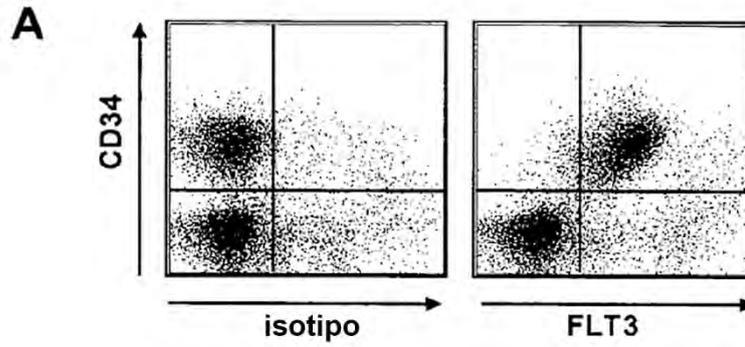


Figura 15

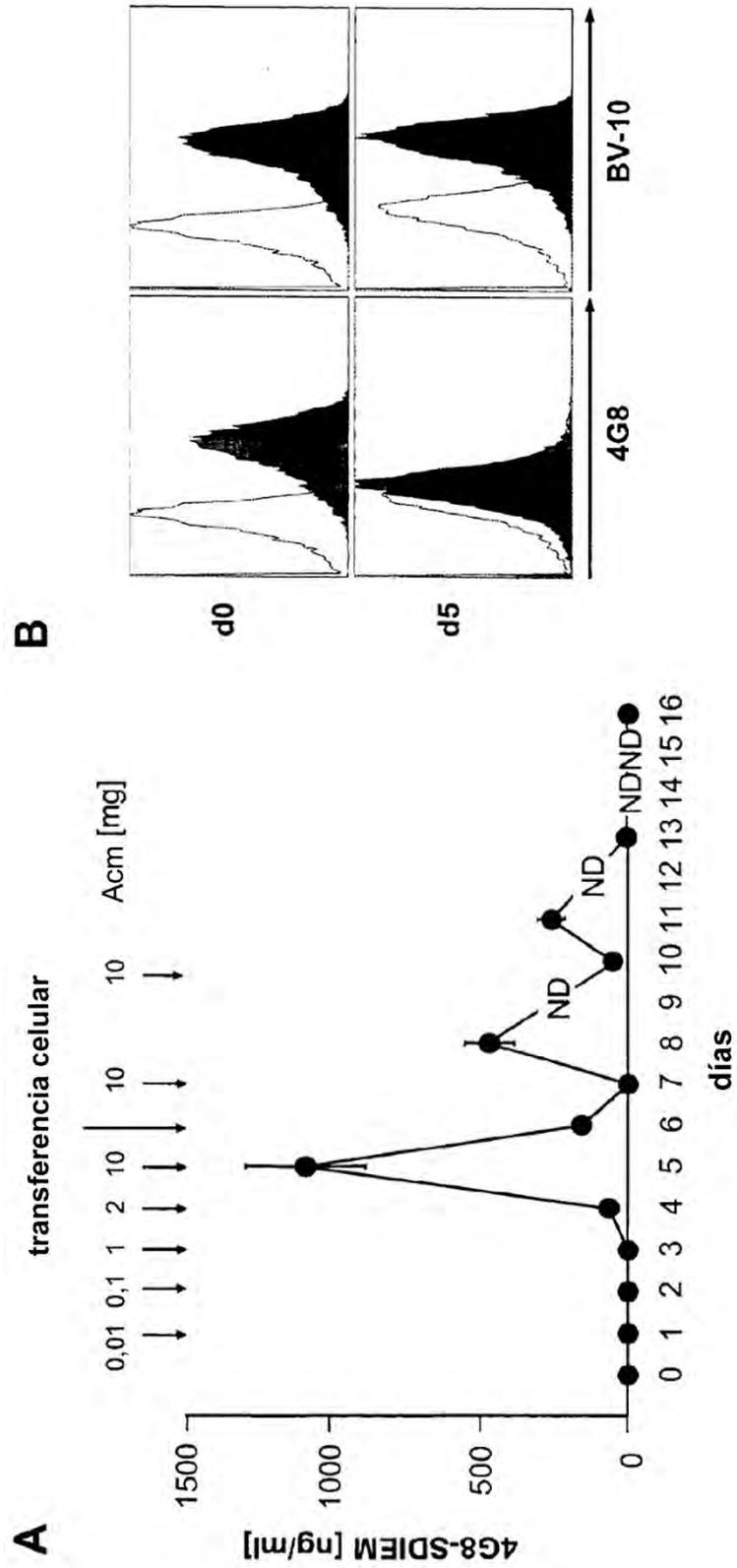


Figura 16

