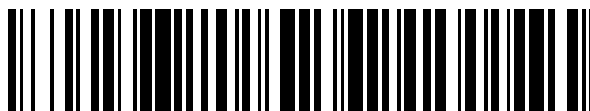


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 583**

15 Folleto corregido: T3

Texto afectado: Descripción

48 Fecha de publicación de la corrección: 05.06.2017

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA CORREGIDA

T9

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2010 PCT/US2010/026825**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10104949**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2010 E 10708865 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2406284**

54 Título: **Anticuerpos anti-BCMA**

30 Prioridad:

10.03.2009 US 158942 P

24.03.2009 US 162924 P

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

09.12.2016

73 Titular/es:

BIOGEN MA INC. (100.0%)

250 Binney Street

Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

KALLED, SUSAN L. y

HSU, YEN-MING

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 593 583 T9

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-BCMA.

- 5 Esta invención se refiere a anticuerpos que se unen al antígeno de superficie de los linfocitos B BCMA. La invención también se refiere al uso de estos anticuerpos para detectar, agotar y, de otra forma, manipular diversos subtipos de linfocitos B.

Los linfocitos B son linfocitos con una incidencia fundamental en la inmunidad humoral adaptiva y la producción de anticuerpos que reconocen específicamente antígenos. Tres subclases de linfocitos B son linfocitos B sin tratar, linfocitos B de memoria y células plasmáticas. Los procesos de recombinación VDJ, en los que se seleccionan dos o tres segmentos de ADN de una biblioteca genómica y se recombinan para generar una matriz combinatoria de dominios variables de anticuerpos, y la hipermutación, mediante la cual los dominios variables codificados por diferentes linajes de linfocitos B se varían adicionalmente, dan como resultado hasta 10^9 linajes de linfocitos B distintos que producen anticuerpos con especificidad para distintas dianas. Se dice que un linfocito B es específico para un antígeno que une los anticuerpos realizados por ese linfocito B. Los linfocitos B, en general, se estimulan mediante la exposición a su antígeno específico (Ag). Los linfocitos B sin tratar aún no se han expuesto a su antígeno específico. Tal exposición (por ejemplo, durante una infección) da como resultado la proliferación de linfocitos B y la generación de clones hermanos. Los clones hermanos se pueden desarrollar en células plasmáticas, que producen cantidades elevadas de anticuerpo. Las células plasmáticas pueden tener una vida corta o pueden migrar a la médula ósea, donde pueden persistir durante un periodo de tiempo prolongado. Un clon hermano de un linfocito B expuesto al Ag también se puede desarrollar en un linfocito B de memoria que se encuentra latente hasta la nueva exposición al antígeno específico. Los linfocitos B de memoria responden con rapidez a la nueva exposición al antígeno al dividirse para producir tanto células plasmáticas como linfocitos B de memoria adicional. Los linfocitos B de memoria incluyen linfocitos B de memoria con cambios ($CD19^+CD27^{high}CD38^{low}IgD^-$), linfocitos B de memoria sin cambios ($CD19^+CD27^{high}CD38^{low}IgD^+$), y linfocitos B de memoria de doble negativo ($CD19^+CD27^-CD38^{low}IgD^-$).

Varias enfermedades significativas implican linfocitos B. La transformación maligna de los linfocitos B conduce a cánceres, incluyendo algunos linfomas como, por ejemplo, mieloma múltiple y linfoma de Hodgkin. Algunas enfermedades autoinmunes, incluyendo lupus eritematoso sistémico (SLE), también implican linfocitos B. Tanto el cáncer como las enfermedades autoinmunes que implican linfocitos B se pueden considerar afecciones de ganancia de función, ya que los linfocitos B sobrepasan y/o atacan partes del cuerpo de forma inapropiada. Una estrategia posible para controlar tales enfermedades es utilizar anticuerpos que se dirijan a los linfocitos B patológicos.

El antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA, también conocido como TNFRSF17 y CD269) es una proteína que se ha demostrado que se expresa en la superficie de los plasmablastos (es decir, precursores celulares plasmáticos) y las células plasmáticas, y se considera que estimula la supervivencia. Por lo tanto, representa un posible objetivo para las enfermedades relacionadas con los linfocitos B. El BCMA es un miembro de la familia de receptores del TNF y une los ligandos de la familia del TNF BAFF y APRIL (revisado en Kalled y col. (2005), *Curr Dir Autoimmun* 8: 206-242). El BCMA es una proteína de membrana de tipo III, ya que carece del péptido de señal asociado a las proteínas de membrana de tipo I que se encuentran en la mayoría de los miembros de la familia de receptores del TNF.

Se ha detectado ARN del BCMA en el bazo, los nódulos linfáticos, el timo, las glándulas adrenales y el hígado, y el análisis de una cantidad de líneas de linfocitos B indicó que los niveles de ARNm del BCMA aumentaron tras la maduración. Se ha detectado la proteína del BCMA humano en diversos subtipos de linfocitos B $CD38^+$, en particular, en células plasmáticas (Zhang y col. (2005), *Int Immunol* 17: 779-788; Darce y col. (2007), *J Immunol* 179: 7276-7286; Sims y col. (2005), *Blood* 105: 4390-4398; Avery y col. (2003), *J Clin Invest* 112: 286-297). Laboratorios independientes han examinado subconjuntos de linfocitos B de la sangre y/o las amígdalas y han descubierto que la expresión del BCMA no se podía detectar en linfocitos B de memoria o sin tratar (Zhang y col. (2005), *Int Immunol* 17: 779-788; Darce y col. (2007), *J Immunol* 179: 7276-7286; Chiu y col. (2007), *Blood* 109: 729-739). Los intentos de detectar la proteína del BCMA en la superficie de linfocitos B del centro germinal han tenido resultados contradictorios (Zhang y col. (2005), *Int Immunol* 17: 779-788; Chiu y col. (2007), *Blood* 109: 729-739).

El mecanismo de acción del BCMA no se comprende por completo. Los ratones que han sufrido una alteración genética para que carezcan de un gen funcional para el BCMA tienen órganos linfoides y poblaciones celulares normales y un sistema inmunológico con funcionamiento casi normal (Xu y Lam (2001), *Mol Cell Biol* 21: 4067-4074; Schiemann y col. (2001), *Science* 293: 2111-2114). El único defecto definido hasta la fecha en estos ratones es una

- menor supervivencia de las células plasmáticas de la médula ósea (MO) de vida prolongada (O'Connor y col. (2004), J Exp Med 199: 91-98). Por lo tanto, podría ser que el BCMA proporcione una señal de supervivencia a las células plasmáticas que residen en la médula ósea mediada por BAFF, APRIL o ambas, al menos en el sistema murino. De hecho, la señalización a través del BCMA activa la ruta NF- κ B (Hatzoglou y col. (2000), J Immunol 165: 1322-1330)
- 5 que se encuentra implicada en la supervivencia, la proliferación y la maduración de los linfocitos B (Litinskiy y col. (2002) Nat Immunol 3: 822-829; Pomerantz y Baltimore (2002) Mol Cell 10: 693-695; Huang y col. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101: 17789-17794; He y col. (2004) J Immunol 172: 3268-3279). Los resultados con células humanas malignas generalmente concuerdan con un nexo entre el BCMA y la supervivencia celular. Las células de mieloma múltiple (MM) primario, líneas celulares de MM (Novak y col. (2004) Blood 103: 689-694) y las células de Hodgkin y
- 10 Reed-Sternberg (HRS) de linfomas de Hodgkin (Chiu y col. (2007), Blood 109: 729-739; Novak y col. (2004), Blood 104: 2247-2253) han demostrado expresar el BCMA. La adición de BAFF y/o APRIL ha demostrado además que proporciona una señal de supervivencia para estas células malignas, aunque no está claro que el BCMA sea el responsable predominante de este efecto.
- 15 Ryan y col. indican anticuerpos BCMA que pueden actuar sobre las líneas celulares de mieloma múltiple a través de múltiples mecanismos que incluyen la inhibición de la activación de NF- κ B dependiente de APRIL, la promoción de la lisis de células tumorales por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por células asesinas naturales, y la inducción de citotoxicidad de conjugados de anticuerpo-fármaco (Ryan y col. (2007), Mol Cancer Ther; 6 (11)).
- 20 El documento WO 02/066516 desvela anticuerpos que unen dos miembros de la familia de receptores del factor de la necrosis tumoral: el activador transmembrana y el modulador de calcio y el receptor de interacción del ligando de ciclofilina (TACI), y el receptor de maduración de linfocitos B (BCMA).
- 25 Debido a que diferentes subconjuntos de linfocitos B se encuentran implicados en diferentes afecciones relacionadas con los linfocitos B, existe la necesidad de agentes que se dirijan de forma específica a uno o más subconjuntos de linfocitos B. La expresión del BCMA en la superficie de algunos linfocitos B proporciona un marcador mediante el cual esas células se pueden fijar de forma específica como objetivo. Para poder aprovechar el BCMA como marcador de uno o más subconjuntos de linfocitos B, existe la necesidad de agentes que se unan de
- 30 forma específica al BCMA, así como de la determinación de qué subconjuntos de linfocitos B se unen mediante esos agentes específicos de BCMA. La invención proporciona anticuerpos que se unen de forma específica al BCMA. Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para dirigirse a uno o más de los siguientes subconjuntos de linfocitos B: células plasmáticas, linfocitos B de memoria y linfocitos B sin tratar.
- 35 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**
- La **figura 1** representa la unión de mAb anti-BCMA humano en células CHO transfectadas con BCMA. La unión de mAb anti-BCMA humanos conjugados con biotina, visualizada con Estreptavidina-PE, se midió a través de citometría de flujo en una línea celular estable BCMA-CHO (A) y células CHO sin transfectar de control (B). El área sombreada representa la tinción de células con un mAb de control del isotipo.
- 40 La **figura 2** representa la unión del anti-BCMA a los subconjuntos de linfocitos B. Los subconjuntos de linfocitos B en sangre periférica humana se evaluaron a través de citometría de flujo para determinar la reactividad a los mAb anti-BCMA. La visualización fue como se muestra en la figura 1. El área sombreada representa la tinción con un Ab de control del isotipo. Los subconjuntos de linfocitos B eran células plasmáticas (CD19⁺CD27^{high}CD38^{high}IgD⁻) (A), linfocitos B de memoria con cambios
- 45 (CD19⁺CD27^{high}CD38^{low}IgD⁻) (B), linfocitos B de memoria sin cambios (CD19⁺CD27^{high}CD38^{low}IgD⁺) (C), linfocitos B de memoria de doble negativo (CD19⁺CD27⁻CD38^{low}IgD⁻) (D), y linfocitos B sin tratar (CD19⁺CD27⁻IgD⁺) (E).
- 50 La **figura 3** representa la unión del anti-BCMA a subconjuntos de linfocitos B aislados de individuos sanos y con SLE. Los subconjuntos de linfocitos B en sangre periférica humana de un voluntario sano y un paciente con SLE se evaluaron a través de citometría de flujo para determinar la reactividad a los mAb anti-BCMA C12A3.2 y A7D12.2. Los subconjuntos de linfocitos B fueron como se muestra en la figura 2. La visualización fue como se muestra en la figura 1.
- 55 La **figura 4** representa la tinción por citometría de flujo de células plasmáticas humanas en el compartimiento CD45⁺ humano del esplenocito aisladas de ratones HSC/NSG. Las células de plasma esplénico se tiñeron con los anticuerpos anti-BCMA A7D12.2 (panel izquierdo, línea en negrita) y C12A3.2 (panel derecho, línea en negrita) o un Ab de IgG2b o IgG2 de ratón de control del isotipo, respectivamente (línea fina en ambos paneles).

La **figura 5** representa la tinción por citometría de flujo para las células plasmáticas (PC) en el compartimiento CD45⁺ humano del esplenocito aisladas de ratones HSC/NSG tratados con anticuerpo anti-BCMA (chC12A3.2 o chC13F12.1) o control de IgG1 humana. Los ratones recibieron una inyección i.p. de Ab anti-BCMA o control de 5 HlgG1 dos veces por semana durante 2 semanas. ** p<0,0001; * p = 0,0066.

La **figura 6** representa la tinción por citometría de flujo para las células plasmáticas (PC) en el compartimiento CD45⁺ humano del esplenocito aisladas de ratones HSC/NSG tratados con anticuerpo anti-BCMA (chCHD5.1 o chA7D12.2) o control de IgG1 humana. Los ratones recibieron una inyección i.p. de anticuerpo anti-BCMA o control 10 de HlgG1 dos veces por semana durante 2 semanas.

Tabla 1. Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO	Descripción de secuencia
1	secuencia de proteína de dominio variable de cadena pesada madura A7D12.2
2	secuencia de proteína de dominio variable de cadena ligera madura A7D12.2
3	secuencia de proteína de dominio variable de cadena pesada madura C11D5.3
4	secuencia de proteína de dominio variable de cadena ligera madura A C11D5.3
5	secuencia de proteína de dominio variable de cadena pesada madura C12A3.2
6	secuencia de proteína de dominio variable de cadena ligera madura C12A3.2
7	secuencia de proteína de dominio variable de cadena pesada madura C13F12.1
8	secuencia de proteína de dominio variable de cadena ligera madura C13F12.1
9	secuencia de proteína de BCMA
10	huBCMA-huFc (como se define por el análisis de secuencia N-terminal)
11	secuencia B de proteína de dominio variable de cadena ligera madura C11D5.3
12	secuencia C de proteína de dominio variable de cadena ligera madura C11D5.3
13	secuencia de proteína de cadena pesada madura quimérica chA7D12.2
14	secuencia de proteína de cadena ligera madura quimérica chA7D12.2
15	secuencia de proteína de cadena pesada madura quimérica chC11 D5.3
16	secuencia A de proteína de cadena ligera madura quimérica chC11 D5.3
17	secuencia C de proteína de cadena ligera madura quimérica chC11 D5.3
18	secuencia de proteína de cadena pesada madura quimérica chC12A3.2
19	secuencia de proteína de cadena ligera madura quimérica chC12A3.2
20	secuencia de proteína de cadena pesada madura quimérica chC13F12.1
21	secuencia de proteína de cadena ligera madura quimérica chC13F12.1
22	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC11D5.3L1
23	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC11D5.3L2
24	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC11D5.3L3
25	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC11D5.3H0
26	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC11D5.3H1
27	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC11D5.3H2
28	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC11D5.3H3
29	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC11D5.3H4
30	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC12A3.2L0
31	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC12A3.2L1
32	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC12A3.2L2
33	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC12A3.2L3
34	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC12A3.2H0
35	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC12A3.2H1
36	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC12A3.2H2
37	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC12A3.2H3
38	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC12A3.2H4
39	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC13F12.1L0
40	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC13F12.1L1
41	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC13F12.1L2
42	secuencia de dominio variable de cadena ligera madura humanizada huC13F12.1 L3
43	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC13F12.1H0
44	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC13F12.1H1

45	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC13F12.1H2
46	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizadas huC13F12.1H3
47	secuencia de dominio variable de cadena pesada madura humanizada huC13F12.1H4

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

La invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al polipéptido de la SEQ ID NO: 9, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 31-35 de la SEQ ID NO: 3, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 50-66 de la SEQ ID NO: 3, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 99-106 de la SEQ ID NO: 3; y un dominio variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 24-38 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 11 o 12, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 54-60 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 11 o 12, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 93-101 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 11 o 12;
- b) un dominio variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 31-35 de la SEQ ID NO: 5, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 50-66 de la SEQ ID NO: 5, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 99-106 de la SEQ ID NO: 5; y un dominio variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 24-38 de la SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 54-60 de la SEQ ID NO: 6, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 93-101 de la SEQ ID NO: 6; o
- c) un dominio variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 31-35 de la SEQ ID NO: 7, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 50-66 de la SEQ ID NO: 7, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 99-106 de la SEQ ID NO: 7; y un dominio variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 24-38 de la SEQ ID NO: 8, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 54-60 de la SEQ ID NO: 8, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 93-101 de la SEQ ID NO: 8.

La invención proporciona anticuerpos que se unen al BCMA y algunos epítomos de los mismos. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen a uno o más subconjuntos de linfocitos B, como células plasmáticas, linfocitos B de memoria y linfocitos B sin tratar. La invención también proporciona anticuerpos para su uso en el agotamiento de los linfocitos B o subclases de linfocitos B, incluyendo células plasmáticas, linfocitos B de memoria y linfocitos B sin tratar. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a la SEQ ID NO: 9 y se une a las células plasmáticas. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a la SEQ ID NO: 9 y se une a los linfocitos B de memoria. En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a la SEQ ID NO: 9 y se une a los linfocitos B sin tratar.

Algunos mAb anti-BCMA, incluyendo el clon C4E2.2 (IgG de hámster), generado en Legacy Biogen (6), el clon VICKY-1 (IgG1 de rata) (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza, también comercializado como 6D10 por Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y el clon 335004 (IgG2a de rata) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), se encuentran fuera del alcance de la presente invención.

A. Anticuerpos

La invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la SEQ ID NO: 9. La invención también proporciona anticuerpos que se unen a la superficie de linfocitos B o subclases de las mismas, incluyendo células plasmáticas, linfocitos B de memoria (incluyendo con cambios, sin cambios y doble negativo) y/o linfocitos B sin tratar. El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye tanto inmunoglobulinas de longitud completa como fragmentos de anticuerpos que se unen a los mismos antígenos. Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o de cadena sencilla. En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂ y conservan la capacidad de unir de forma específica la proteína de la SEQ ID NO: 9.

En parte, la invención proporciona los anticuerpos C11D5.3, C12A3.2 y C13F12.1. Cada uno de estos es un anticuerpo monoclonal murino. A7D12.2, un anticuerpo adicional descrito en el presente documento, tiene una cadena pesada del subgrupo "miscelánea" de murino, una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es la SEQ ID NO: 1, una cadena ligera kappa del subgrupo I y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es la SEQ ID NO: 2.

C11D5.3 tiene una cadena pesada del subgrupo II(A), una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es la SEQ ID NO: 3, una cadena ligera kappa del subgrupo III de murino y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que se selecciona de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, la 5 secuencia de dominio variable de cadena ligera de C11D5.3 es SEQ ID NO: 12.

C12A3.2 tiene una cadena pesada del subgrupo II(A), una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es la SEQ ID NO: 5, una cadena ligera kappa del subgrupo III y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es la SEQ ID NO: 6.

10

C13F12.1 tiene una cadena pesada del subgrupo II(A), una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es la SEQ ID NO: 7, una cadena ligera kappa del subgrupo III de murino y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es la SEQ ID NO: 8.

15 Las técnicas para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos para la proteína de la SEQ ID NO: 9 se pueden adaptar a partir de las descritas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 4.946.778. Adicionalmente, los métodos se pueden adaptar para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase, por ejemplo, Huse y col. (1989) Science 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para una proteína del BCMA o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los 20 mismos. En la técnica se conocen numerosas técnicas para humanizar anticuerpos no humanos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 5.225.539, 6.632.927 o 5.648.237. Los fragmentos de anticuerpos que contienen los idiotipos para una proteína del BCMA se pueden producir a través de cualquiera de una diversidad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación: (i) un fragmento F(ab')₂ producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo, (ii) un fragmento Fab generado reduciendo los puentes de disulfuro de un fragmento 25 F(ab')₂, (iii) un fragmento Fab generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente de reducción, e (iv) fragmentos Fv.

Adicionalmente, los anticuerpos anti-BCMA recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que se pueden realizar usando técnicas 30 estándar de ADN recombinante, se encuentran dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante tales como, por ejemplo, los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 7.112.421; Better y col. (1988) Science 240: 1041-1043 o Liu y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443.

35 Algunos de los anticuerpos de la invención son formas quiméricas de los anticuerpos monoclonales murinos C11D5.3, C12A3.2 y C13F12.1. Como se describe en el presente documento, una forma quimérica de A7D12.2 comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, una forma quimérica de C11D5.3 comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 16 y la SEQ 40 ID NO: 17, preferentemente la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, una forma quimérica de C12A3.2 comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 18 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, una forma quimérica de C13F12.1 comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 20 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 21.

45 Algunos de los anticuerpos de la invención son formas humanizadas de los anticuerpos monoclonales murinos C11D5.3, C12A3.2 y C13F12.1. En algunas realizaciones, una forma humanizada de C11D5.3 comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos un 95 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 22-24 y una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos un 95 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ 50 ID NO: 25-29. En algunas realizaciones, una forma humanizada de C12A3.2 comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos un 95 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 30-33 y una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos un 95 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 34-38. En algunas realizaciones, una forma humanizada de C13F12.1 comprende un dominio variable de cadena ligera que 55 comprende una secuencia que es al menos un 95 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 39-42 y una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos un 95 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 43-47.

B. Secuencia de dominio variable de anticuerpo

Los anticuerpos de la invención pueden comprender las secuencias de dominio variable de cadena pesada de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7. Las secuencias de dominio variable de cadena pesada pueden consistir esencialmente básicamente en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender las secuencias de dominio variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, o la SEQ ID NO: 12. Las secuencias de dominio variable de cadena ligera pueden consistir básicamente en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, o la SEQ ID NO: 12.

Además, se describe en el presente documento una secuencia de dominio variable que comprende una secuencia que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, y la SEQ ID NO: 7. Además, se describe en el presente documento una secuencia de dominio variable que comprende una secuencia que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, y la SEQ ID NO: 12. También se describen en el presente documento anticuerpos que comprenden una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2. También se describen en el presente documento anticuerpos que comprenden una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, o la SEQ ID NO: 12. También se describen en el presente documento anticuerpos que comprenden una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 5 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 6. También se describen en el presente documento anticuerpos que comprenden una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 8.

La invención también proporciona anticuerpos con regiones determinantes de complementariedad (CDR) particulares. La Tabla 2 define las coordenadas de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 1 a 8, 11 y 12.

Tabla 2. Coordenadas de aminoácidos de CDR

SEQ ID NO	Descripción			
3	C11D5.3 V _H	31-35	50-66	99-106
4	C11D5.3 V _L A	24-38	54-60	93-101
	C12A3.2 V _H	31-35	50-66	99-106
6	C12A3.2 V _L	24-38	54-60	93-101
7	C13F12.1 V _H	31-35	50-66	99-106
8	C13F12.1 V _L	24-38	54-60	93-101
11	C11D5.3 V _L B	24-38	54-60	93-101
12	C11D5.3 V _L C	24-38	54-60	93-101

Las CDR se designan usando las definiciones de Kabat (Johnson y Wu (2000), Nucleic Acids Res 28: 214-218). Como se usa en el presente documento, la "CDR correspondiente" se refiere a la CDR en la posición más similar dentro de la secuencia de aminoácidos de dominio variable.

El dominio variable de cadena pesada de anticuerpos de la invención puede comprender CDR de tal forma que una, dos o tres de las CDR sean idénticas a las CDR correspondientes de la SEQ ID NO: 3; idénticas a las CDR correspondientes de la SEQ ID NO: 5; o idénticas a las CDR correspondientes de la SEQ ID NO: 7. El dominio variable de cadena ligera de anticuerpos de la invención puede comprender CDR de tal forma que una, dos o tres de las CDR sean idénticas a las CDR correspondientes de la SEQ ID NO: 4; idénticas a las CDR correspondientes de la SEQ ID NO: 6; idénticas a las CDR correspondientes de la SEQ ID NO: 8; idénticas a las CDR correspondientes de

la SEQ ID NO: 11; o idénticas a las CDR correspondientes de la SEQ ID NO: 12.

El dominio variable de cadena pesada puede comprender CDR idénticas a cada una de las CDR correspondientes de una de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 7, salvo porque se han hecho una o más sustituciones de aminoácidos en dichas regiones CDR. Las CDR del dominio variable de cadena pesada pueden tener hasta un total de 12 sustituciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 7. El dominio variable de cadena pesada CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento puede tener hasta 10, hasta 8, hasta 5, o hasta 3 sustituciones con respecto a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 7. Las CDR del dominio variable de cadena pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idénticas a las CDR del dominio variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 7.

La CDR2 de la SEQ ID NO: 7 puede reemplazarse por la CDR2 (es decir, los aminoácidos 50-66) de la SEQ ID NO: 46. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender la CDR1 y CDR3 de la SEQ ID NO: 7 y la CDR2 de la SEQ ID NO: 46. El dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento también puede comprender las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 que en conjunto son al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idénticas a la CDR1 y la CDR3 de la SEQ ID NO: 7 y la CDR2 de la SEQ ID NO: 46.

El dominio variable de cadena ligera puede comprender CDR idénticas a las CDR correspondientes de una de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12, excepto para una o más sustituciones de aminoácidos en dichas regiones CDR. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden comprender CDR que son idénticas a las CDR correspondientes de una de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12, excepto para hasta 12, hasta 10, hasta 8, hasta 5, o hasta 3 sustituciones de aminoácidos en dichas regiones CDR. Las CDR de dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idénticas a las CDR del dominio variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.

Las sustituciones en las regiones CDR son sustituciones conservadoras.

C. Epítomos, especificidad de unión a anticuerpos

La invención también proporciona anticuerpos que se unen a epítomos particulares. Si un par de anticuerpos se une al mismo epítomo se determina en base a experimentos de bloqueo cruzado, como se describe en el Ejemplo 4. Los perfiles de bloqueo cruzado se definen para siete anticuerpos en la Tabla 3. Para los fines de esta divulgación, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo epítomo si cada uno reduce la unión del otro al BCMA (es decir, se bloquean mutuamente de forma cruzada) en al menos el 90 %, de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4. De manera similar, los anticuerpos que no reducen la unión del otro en al menos el 90 % como se describe en el Ejemplo 4, se considera que se unen a epítomos distintos. Los perfiles de bloqueo cruzado de anticuerpos con algunos dominios variables se enumeran en la Tabla 3. Los pares de anticuerpos que se unen a epítomos distintos (como se ha definido anteriormente) se indican con una "d".

Tabla 3. Perfiles de bloqueo cruzado

Dominio variable de cadena pesada	Dominio variable de cadena ligera	Ejemplo	Distinto (d) del epítomo unido por:							
			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	C12A3.2	C11D5.3	C13F12.1	335004	C4E2	A7D12.2
1	2	A7D12.2	d	d	d	d	d	d	-	d
3	12	C11D5.3	-	-	-	d	d	d	d	d
5	6	C12A3.2	-	-	-	d	d	d	d	d
7	8	C13F12.1	-	-	-	d	d	d	d	d

Se describen adicionalmente en el presente documento anticuerpos que se unen al mismo epítomo que los anticuerpos A7D12.2, C11D5.3, C12A3.2 o C13F12.1. También se describen anticuerpos que tienen perfiles de bloqueo cruzado que corresponden a los perfiles de A7D12.2, C11D5.3, C12A3.2 o C13F12.1. Por ejemplo,

siguiendo las definiciones que se han proporcionado anteriormente, un anticuerpo que tiene el mismo perfil que C11 D5.3 se une al mismo epítipo en comparación con C12A3.2 y C13F12.1, pero se une a un epítipo distinto en comparación con A7D12.2, 335004, C4E2 y Vicky-1. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden bloquear mutuamente de forma cruzada la unión de uno o más de A7D12.2, C11D5.3, C12A3.2 o C13F12.1 a la proteína de la SEQ ID NO: 9 en al menos el 80 %, 85 %, 90 % o el 95 %. La extensión del bloqueo cruzado se mide de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

En algunas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos de la invención se unen al dominio extracelular del BCMA. En realizaciones particulares, los anticuerpos se unen a los aminoácidos 1-52, 1-51, 1-41 u 8-41 de la SEQ ID NO: 9.

La invención también proporciona anticuerpos anti-BCMA que se unen a uno o más tipos particulares de células. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden unir a uno o más de los siguientes: células plasmáticas, linfocitos B de memoria, linfocitos B sin tratar o células que expresan el BCMA (SEQ ID NO: 9), una proteína similar a las mismas, el dominio extracelular de las mismas, o un polipéptido similar al dominio extracelular de las mismas.

D. Métodos

La invención proporciona un anticuerpo para su uso en el agotamiento de diversos tipos de células. Los usos médicos comprenden administrar los anticuerpos de la invención, como se ha descrito anteriormente. Los tipos de células que se pueden agotar a través de los anticuerpos de la invención incluyen, sin limitación, células plasmáticas, linfocitos B sin tratar, linfocitos B de memoria (incluyendo con cambios, sin cambios y doble negativo), células de linfoma derivadas de linfocitos B y células que expresan el BCMA, una proteína similar a las mismas, el dominio extracelular de las mismas, o un polipéptido similar al dominio extracelular de las mismas. Una célula puede encontrarse en más de una de las categorías anteriores. Para ver un ejemplo de métodos de agotamiento celular mediados por anticuerpos, véase "Depletion of B Cells In Vivo by a Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody to CD20", Mitchell E. Reff, Blood, vol. 83, págs. 435-445, 15 de enero de 1994.

En algunas realizaciones, el uso médico de un anticuerpo de la invención reduce el número de uno o más de los tipos de células que se han enumerado anteriormente en al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %. En algunas realizaciones, el uso médico de un anticuerpo de la invención reduce el número de células plasmáticas en al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %. En algunas realizaciones, el uso médico de un anticuerpo de la invención reduce el número de linfocitos B de memoria con cambios en al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, o al menos el 60 %. En algunas realizaciones, el uso médico de un anticuerpo de la invención reduce el número de linfocitos B de memoria sin cambios en al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, o al menos el 60 %. En algunas realizaciones, el uso médico de un anticuerpo de la invención reduce el número de linfocitos B de memoria de doble negativo en al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, o al menos el 60 %. En algunas realizaciones, el uso médico de un anticuerpo de la invención reduce el número de linfocitos B sin tratar en al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, o al menos el 60 %.

La invención también proporciona un anticuerpo para su uso en la reducción de los niveles de inmunoglobulina en suero que comprende un anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, dichos usos médicos reducen los niveles de IgM en suero. En realizaciones particulares, el uso médico de un anticuerpo de la invención reduce los niveles de IgM en suero en al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, o al menos el 65 %. En algunas realizaciones, dichos usos médicos reducen los niveles de IgG en suero. En algunas realizaciones, dichos usos médicos reducen los niveles de una o ambas de IgG2 e IgG3. En algunas realizaciones, dichos usos médicos reducen los niveles de IgG2 en al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, o al menos el 70 %. En algunas realizaciones, dichos usos médicos reducen los niveles de IgG3 en al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, o al menos el 80 %. En algunas realizaciones, dichos usos médicos reducen los niveles de IgG2, IgG3 e IgM.

La invención también proporciona un anticuerpo para su uso en la reducción del nivel de al menos un autoanticuerpo que comprende administrar un anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, dichos usos médicos reducen el nivel de uno o más autoanticuerpos en al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %.

Aún en un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos para su uso en el tratamiento o prevención o retraso de un trastorno o afección mediados por linfocitos B. El uso médico incluye administrar a un sujeto para el que se desea el tratamiento, prevención o retraso, un anticuerpo de la invención en una cantidad suficiente para tratar, prevenir o retrasar una afección tumorigénica o inmunorreguladora en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano. En algunas realizaciones, la administración del anticuerpo de la invención bloquea la señalización mediada por BCMA en el sujeto, lo que puede dar como resultado uno o más de muerte celular, inhibición, reducción o cese de la proliferación celular.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención utilizan el BCMA para "dirigirse a" linfomas de linfocitos B. Básicamente, tal direccionamiento se puede generalizar como se indica a continuación: los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención específicos para el antígeno superficial BCMA de los linfocitos B se inyectan, por ejemplo, en un sujeto y se unen específicamente al antígeno de la superficie celular BCMA de (ostensiblemente) linfocitos B normales y malignos; esta unión conduce a la destrucción y/o el agotamiento de los linfocitos B neoplásicos. Adicionalmente, los agentes químicos o las etiquetas radioactivas que tienen el potencial de destruir células y/o tumores cancerosos se pueden conjugar con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención de forma que el agente se "administre" específicamente a los linfocitos B diana, tales como, por ejemplo, linfocitos B neoplásicos. En algunas realizaciones, los usos médicos de la invención comprenden administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que no se conjuga con un agente químico o una etiqueta radioactiva. En algunas realizaciones, los usos médicos de la invención comprenden administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que no se conjuga con un agente citotóxico.

Los trastornos relacionados con linfocitos B incluyen, sin limitación, trastornos autoinmunes que implican la actividad inadecuada de los linfocitos B y linfomas de linfocitos B. Los linfomas de linfocitos B incluyen, sin limitación, mieloma múltiple, plasmacitoma, linfoma de Hodgkin, linfomas foliculares, linfomas de células pequeñas no escindidas, linfoma endémico de Burkitt, linfoma esporádico de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma extranodal de tejido linfoide asociado a mucosas, linfoma nodal de linfocitos B monocitoides, linfoma esplénico, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma de células mezcladas difusas, linfoma inmunoblástico, linfoma primario mediastinal de linfocitos B, linfoma angiocéntrico de linfocitos B pulmonares y linfoma linfocítico pequeño. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención también se pueden utilizar para tratar cánceres en los que las células cancerosas expresan BCMA. Los trastornos relacionados con linfocitos B incluyen adicionalmente proliferaciones de linfocitos B con un potencial maligno incierto, tales como, por ejemplo, granulomatosis linfomatoide y trastorno linfoproliferativo postrasplante.

Las afecciones que se diagnostican, tratan, previenen o retrasan usando los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención pueden ser, adicionalmente, un trastorno inmunorregulador. Estos trastornos incluyen aquellos de naturaleza autoinmune, tales como, por ejemplo, lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopenia idiopática, síndrome anti-fosfolípido, enfermedad de Chagas, enfermedad de Grave, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, síndrome de Sjogren, pénfigo vulgar, escleroderma, esclerosis múltiple, síndrome anti-fosfolípido, vasculitis asociada a ANCA, enfermedad de Goodpasture, enfermedad de Kawasaki y glomerulonefritis rápidamente progresiva. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención también tienen aplicación en trastornos de células plasmáticas, tales como enfermedad de las cadenas pesadas, amiloidosis primaria o asociada a inmunocitos y gammapatía monoclonal de importancia indeterminada.

Las composiciones y los usos médicos de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden utilizar con cualquier afección asociada a una proliferación celular que expresa BCMA no deseada.

Los anticuerpos de la Invención también se pueden administrar junto con el anticuerpo C2B8 de la Patente de Estados Unidos 5.736.137, también conocido como RITUXAN™. En algunas realizaciones, dicha administración combinada agota o inhibe la proliferación de múltiples subtipos de linfocitos B.

Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden usarse para ensayar fenotipos de linfocitos B, tal como la determinación de la presencia, ausencia o cantidad de un marcador en la superficie de un linfocito B o un

subtipo de linfocito B. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para medir la presencia de un marcador asociado al SLE u otra afección relacionada con linfocitos B en la superficie de linfocitos B sin tratar, linfocitos B de memoria, linfocitos B de memoria IgD+, linfocitos B de memoria IgD- o linfocitos B de memoria doble negativo.

5

E. Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas útiles para administración. Tales composiciones típicamente comprenden anticuerpos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se
10 usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, diluyentes y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo. Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero sin limitación, agua,
15 solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina sérica humana al 5 %. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Salvo en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los anticuerpos, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

20

Una composición farmacéutica que comprende anticuerpos de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicaciones parenterales, intradérmicas o subcutáneas pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como
25 agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tal como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA); tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se
30 puede contener en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple fabricados de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremofor EL (BASF, Parsippany, N.J.) o una solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida en la medida en que exista la posibilidad de incluirla en una jeringa fácilmente. Debe ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol,
40 propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, utilizando un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la
45 composición, agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tal como manitol, sorbitol y cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando anticuerpos de la invención en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes que se han enumerado
50 anteriormente, según sea necesario, seguido de una esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los anticuerpos en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los que se han enumerado anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que
55 produce un polvo de los anticuerpos más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente estéril de los mismos.

En una realización, los anticuerpos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto de la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración

microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener en el mercado en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos) también se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Adicionalmente, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden utilizar para dirigir las suspensiones liposomales a linfocitos B o subclases de los mismos, a los que se une el anticuerpo particular. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 4.522.811.

10

Las composiciones parenterales se pueden formular en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y lograr la uniformidad de la dosificación. Las formas de dosificación unitaria como se utilizan en el presente documento, se refieren a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se desea tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de anticuerpo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención está sujeta a y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea lograr.

15

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador, junto con instrucciones para su administración.

20

Ejemplo 1. Generación y conjugación con biotina de anticuerpos monoclonales anti-BCMA humano

Los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-BCMA se generaron inmunizando ratones RBF hembra con proteína conjugada BCMA-Fc/KLH i.p. en CFA, seguido de inmunizaciones adicionales en intervalos regulares con IFA, salvo porque el último estímulo utilizó RIBI en lugar de IFA, antes de la fusión de los esplenocitos con la línea celular de mieloma FL653 según el método de Harlow y Lane (1998), Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. 1, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. En resumen, los esplenocitos aislados de un ratón 3 días después del estímulo final se lavaron dos veces y se mezclaron en una proporción de 7:1 con células de mieloma FL653 de fase logarítmica con dos lavados. La mezcla celular se separó en cuatro, se sedimentó y se incubó en PEG a 37 °C durante 1 min, durante lo cual las células se volvieron a suspender suavemente, seguido de la adición cuidadosa de 10 ml de DMEM enfriado con hielo. Las células se mezclaron, se sedimentaron y se volvieron a suspender en medio de selección de crecimiento de hibridoma AAT. Los sobrenadantes celulares se analizaron para determinar la reactividad específica para BCMA mediante ELISA y citometría de flujo. Los clones con un resultado positivo para BCMA y negativo para la especificidad a Fe en un formato de ELISA, positivos para células transfectadas con el BCMA y negativos para células transfectadas con mock, se expandieron y se subclonaron. Cuatro clones específicos para el BCMA se seleccionaron para una evaluación adicional: C11D5.3 (IgG1), C12A3.2 (IgG1), C13F12.1 (IgG1) and A7D12.2 (IgG2b). Los anticuerpos monoclonales anti-BCMA se conjugaron con biotina para su uso en experimentos ELISA y FACS descritos a continuación utilizando un kit de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR).

30

35

40

Ejemplo 2. Clonación de regiones variables de anticuerpos monoclonales anti-BCMA humano de murino

El ARN celular total de células de hibridoma murino se preparó utilizando un mini kit Qiagen RNeasy, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las regiones variables que codifican ADNc de las cadenas ligeras y pesadas se clonaron mediante RT-PCR a partir de ARN celular total, utilizando hexámeros aleatorios para cebar el ADNc de primera cadena. Para la amplificación por PCR de los dominios variables de inmunoglobulina de murino con secuencias de señal intactas, se utilizaron un cóctel de cebadores directos redundantes que se hibridan con múltiples secuencias de señal de la familia génica de inmunoglobulina de murino y un único cebador inverso específico para el extremo 5' del dominio constante de murino. Se realizó una PCR usando la mezcla de polimerasas de Clontech Advantage 2, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se subclonaron en el vector pCR2.1TOPO de Invitrogen usando su kit de clonación TOPO, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se secuenciaron los insertos de múltiples subclones independientes para establecer una secuencia de consenso. Los extremos N de inmunoglobulina madura eran coherentes con los determinados mediante degradación de Edman a partir del hibridoma. La asignación a subconjuntos específicos se basó en el análisis BLAST, usando secuencias de dominio variable de inmunoglobulina de consenso de la base de datos de Kabat (Johnson y Wu (2000), Nucleic Acids Res 28: 214-218). Las CDR se designaron usando las definiciones de Kabat (Johnson y Wu (2000), Nucleic Acids Res 28: 214-218).

45

50

55

Ejemplo 3. Desarrollo de líneas celulares CHO estables que expresan BCMA y evaluación de anticuerpos monoclonales anti-BCMA humano

Para validar la unión específica al BCMA, se analizaron mAb anti-BCMA en una línea celular CHO que expresaba BCMA. La línea celular CHO estable que expresaba BCMA se generó usando un método que se ha descrito previamente (Brezinsky y col. (2003), *J Immunol Methods* 277: 141-155). En resumen, se transfectaron aproximadamente 1,5 millones de células de ovario de hámster chino (CHO) DG44 deficientes para la dihidrofolato reductasa (DHFR) con 4 µg de ADN de plásmido PV90 que contenía el gen del BCMA humano, usando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche, Indianápolis, IN). Después de la transfección, las células se cultivaron en platos de cultivo de 6 pocillos. Veinticuatro horas después de la transfección, el medio de crecimiento se cambió a MEM sin alfa (Gibco, Rockville, MD), 10 % de suero dializado (Hyclone, Logan, UT) y L-glutamina 2 mM (Gibco, Rockville, MD), y las células se agruparon y se dividieron en tres matraces de cultivo de tejido T-75 y se dejaron crecer hasta lograr la confluencia. Siete días después de la transfección, las células se agruparon nuevamente y se separaron en cinco matraces de cultivo de tejido T225 y se dejaron crecer hasta lograr la confluencia.

Catorce días después de la transfección, las células se incubaron con el Ab C4E2.2 (6) y se clasificaron para determinar los linfocitos BCMA+. Estas células se cultivaron en cultivo y se clasificaron una segunda vez con células positivas clasificadas en placas de 96 pocillos. Los clones se expandieron y se evaluaron para determinar la expresión de BCMA usando el clon C4E2.2.

El clon con mayor expresión se utilizó para evaluar nuevos mAb anti-BCMA humano, con las células CHO sin transfectar como control. En resumen, los linfocitos BCMA-CHO se trataron previamente con tampón FACS más el 5 % de suero de ratón normal para bloquear los sitios de unión no específicos. Se incubaron por separado siete mAb anti-BCMA -C11D5.3, C12A3.2, C13F12.1 y A7D12.2, y los mAb anti-BCMA disponibles en el mercado C4E2.2 (Legacy Biogen), VICKY-1 (Alexis) y 335004 (R&D Systems, Inc.)- y los anticuerpos de control de isotipos, con células durante 30 minutos en hielo a 1 µg/ml, y se lavaron. Los Ab de control de isotipos conjugados con biotina fueron como se indica a continuación: IgG1 de ratón, eBioscience, n.º de cat. 13-4714-85; IgG2a de ratón, n.º de cat. eBioscience, n.º de cat. 13-4732-85; IgG1 de hámster, BD Pharmingen, n.º de cat. 553970; IgG2a de rata, eBioscience, n.º de cat. 13-4321-82. Para visualizar la tinción positiva, se añadió Estreptavidina-PE (Molecular Probes, Eugene, OR) a las células durante 30 minutos en hielo, después de lo cual las células se lavaron, se fijaron en paraformaldehído al 0,8 %, se sometieron a un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) y se analizaron usando el software Flowjo (TreeStar, Ashland, OR). Los resultados se muestran en la figura 1.

Los siete anticuerpos mostraron un reconocimiento específico de las células que expresan BCMA. C11D5.3 mostró una unión basal ligeramente mayor a las células de control negativo que al mAb de control; la unión basal de los otros seis anticuerpos a las células de control negativo fue similar a la del Ab de control.

Ejemplo 4. Análisis de la superposición del epítipo del mAb anti-BCMA mediante ELISA de bloqueo cruzado

Los siete mAb anti-BCMA ensayados en el Ejemplo 3 se evaluaron después en un ensayo de bloqueo cruzado para determinar la presencia o ausencia de superposición del epítipo entre cada anticuerpo. Se incubaron placas Corning de fondo plano de 96 pocillos durante una noche a 4 °C con 10 µg/ml de Fc anti-humano de ratón en una solución 50 mM de bicarbonato sódico con pH 9,6, se lavaron y se incubaron con 2 µg/ml de Fc BCMA humano (SEQ ID NO: 10) a 37 °C durante 1 hora, se lavaron de nuevo y se bloquearon los sitios de unión no específicos con tampón de bloqueo (BSA al 3 % en PBS) durante 30 minutos a 37 °C. Después, los pocillos por triplicado se incubaron con cada clon de mAb anti-BCMA sin conjugar en tampón de bloqueo a una concentración de diez veces la concentración del único mAb anti-BCMA conjugado con biotina usado en cada experimento individual. Se añadió un único clon de mAb anti-BCMA conjugado con biotina en tampón de bloqueo a todos los pocillos a una concentración predeterminada para dar el 80 % de la señal máxima (EC80) y se incubó durante 1 h a 37 °C, después de lo cual los pocillos se lavaron y se incubaron con una solución de estreptavidina-HRP durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron y se incubaron con sustrato, TMB, para visualizar la reactividad positiva. La reactividad enzimática se detuvo añadiendo ácido sulfúrico 2 N, y la absorbancia a 450 nm se midió usando un lector de placas.

Para cada especie de anticuerpo conjugado con biotina, las lecturas de control en las que los anticuerpos conjugados y sin conjugar eran iguales (salvo por la presencia/ausencia de biotina conjugada) se consideraron niveles de fondo, es decir, la absorbancia de este control se restó de cada lectura experimental para ese anticuerpo. En algunos casos, la resta del fondo dio como resultado valores ligeramente negativos. Si bien es posible que el anticuerpo etiquetado se bloqueara de forma ligeramente más eficaz mediante un anticuerpo sin conjugar diferente

que mediante sí mismo, estos valores ligeramente negativos también podrían ser resultado de la variación experimental. Después, los resultados se expresaron como un porcentaje del valor de control positivo, es decir, la lectura de absorbancia ajustada al fondo para el anticuerpo conjugado con biotina en ausencia de un anticuerpo no conjugado de competencia.

5

Se consideró que los anticuerpos unían el mismo epítipo o epítipos en superposición muy cercana si cada uno de ellos reducía la unión del otro (de acuerdo con la fracción calculada como anteriormente) a menos del 20 % del valor del control positivo. En caso de no satisfacer esta condición, se consideró que tenían epítipos al menos parcialmente distintos. La Tabla 3 muestra qué anticuerpos tienen epítipos al menos parcialmente distintos.

10

Ejemplo 5. Análisis por citometría de flujo de la unión de anticuerpos a células de sangre periférica humana

La sangre se obtuvo de voluntarios sanos que dieron su consentimiento y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se enriquecieron mediante centrifugación a través de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Reino Unido), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las PBMC se lavaron de forma extensa en PBS antes de su uso. Las células se trataron previamente con tampón FACS que contenía suero de ratón normal al 5 % para bloquear los sitios de unión no específicos. Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforo dirigidos contra marcadores de células plasmáticas y linfocitos B específicos: anti-CD19-PE-Cy5, anti-IgD-FITC, anti-CD27-APC, anti-CD38-PE-Cy7 (BD Biosciences, San Jose, CA). Se usó estreptavidina-PE (Molecular Probes, Eugene, OR) para visualizar los mAb anti-BCMA conjugados con biotina (10 µg/ml). También se midió la unión de un mAb de control de isotipos como en el Ejemplo 3.

Ninguno de los mAb anti-BCMA tiñó los linfocitos B sin tratar de los voluntarios sanos (figura 2E), mientras que todos tiñeron las células plasmáticas, aunque con intensidades variables (figura 2A). Solamente el clon A7D12.2 tiñó una proporción de los tres subconjuntos de linfocitos B de memoria (figura 2B-D).

25

Ejemplo 6. Comparación de la unión de anticuerpos a linfocitos B de individuos sanos y con SLE

La sangre se obtuvo de voluntarios sanos que dieron su consentimiento y pacientes con SLE y se procesó como en el Ejemplo 5. La figura 3 muestra una comparación entre las muestras de un voluntario sano y un paciente con SLE representativo. El anticuerpo A7D12.2 se unió a las células plasmáticas tanto de los voluntarios sanos como de los pacientes con SLE (figura 3A). En las muestras con SLE, pero no en las muestras sanas, el anticuerpo A7D12.2 se unió a los linfocitos B sin tratar (figura 3E). La unión del anticuerpo A7D12.2 a los linfocitos B de memoria (figura 3B-D), particularmente a linfocitos B de memoria doble negativos (figura 3D), aumentó en las muestras con SLE.

35

Ejemplo 7. Generación de líneas celulares que producen mAb anti-BCMA quiméricos

Se usó CHO-DG44-I, una línea celular de ovario de hámster chino independiente de insulina y dhfr-deficiente, para construir líneas celulares de tipo silvestre anti-BCMA. Las células huésped se cultivaron en medio CHO-S-SFM II con nucleósidos antes de la transfección.

40

Los anticuerpos quiméricos se produjeron transfectando las células con plásmidos de expresión que codificaban las secuencias de cadena ligera y pesada maduras enumeradas en la Tabla 4.

45

Tabla 4. Secuencias de cadena pesada y ligera maduras de anticuerpos anti-BCMA quiméricos

Anticuerpo quimérico	Secuencia de cadena pesada madura	Secuencia de cadena ligera madura
chA7D12.2	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
chC11D5.3	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16 (para el Ejemplo 8) SEQ ID NO: 17 (para el Ejemplo 9)
chC12A3.2	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19
chC13F12.1	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 20

Los plásmidos de expresión anti-BCMA quiméricos se transfectaron en la línea celular huésped CHO DG44-I usando un método de lípido catiónico (Fugene HD). En resumen, se sembraron 1×10^6 células DG44-I en cada uno de dos pocillos de una placa de 6 pocillos que contenía 3 ml de medio CHO-S-SFMII con nucleósidos por pocillo. Se diluyeron cuatro µg de ADN de plásmido (2 µg de cadena pesada, 2 µg de cadena ligera) en 200 µl de medio CHO-S-SFM II (Invitrogen) a temperatura ambiente. Se dejó que dieciséis µl de reactivo Fugene HD (Roche) formaran un complejo con el ADN durante aproximadamente 15 minutos. Se añadieron 100 µl de la mezcla de ADN en complejo

50

a cada pocillo que contenía las células. Después de tres días, las células transfectadas se combinaron y se transfirieron a un matraz T-75 que contenía 20 ml de medio CHO-S-SFM II sin nucleósidos que contenía 400 µg/ml de geneticina (Invitrogen). Las células se controlaron para determinar la viabilidad y se aumentaron en escala en consecuencia. A mediada que las células se aumentaban en escala, se adaptaron al medio de producción. Las 5 líneas celulares clónales se obtuvieron mediante FACS, separando las células individuales de la población estable.

Las células CHO-DG44-I transfectadas de forma estable con cadenas ligeras y pesadas quiméricas se fermentaron en medio CHOM39, se recolectaron y se retiraron mediante centrifugación. El pH del medio depurado se ajustó antes del pase a través de una columna de flujo rápido de proteína A. Los anticuerpos se eluyeron con tampón 10 citrato-Na 100 mM, pH 3,0, se neutralizaron hasta un pH de 7,0 usando un 10 % (v/v) de glicina 2 M, pH 8,9, y la solución de anticuerpo recuperada se intercambió con tampón en PBS (pH 7,2) usando una cromatografía de exclusión por tamaño Superdex 200 en condiciones libres de endotoxina. La proteína purificada se mantuvo a - 80 °C.

15 **Ejemplo 8. Inactivación mediada por anti-BCMA *in vitro***

Células y cultivo celular

Se cultivaron células de plasmacitoma humano JJN-3 (DSMZ ACC 541) en medio de cultivo que consistía en MEM 20 de Dulbecco al 40 %, MDM de Iscove al 40 % y FBS al 20 %, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células de plasmacitoma humano U266 (ATCC TIB 196) se cultivaron en medio de cultivo que consistía en RPMI 1640, FBS al 15 %, HEPES 20 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Todas las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5 %. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de un donante sano normal que dio su consentimiento mediante centrifugación por densidad a 25 través de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) *in vitro*

El diluyente del ensayo fue RPMI 1640, BSA al 1 %, HEPES 20 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de 30 estreptomycin. Las líneas celulares de plasmacitoma humano JJN-3 y U266 se lavaron y se volvieron a suspender en diluyente de ensayo hasta $0,4 \times 10^6$ células por ml. Se colocaron 50 µl de cada suspensión celular en una placa de microtitulación de fondo en U de 96 pocillos por triplicado. Se añadieron 50 µl de anticuerpos anti-BCMA quiméricos diluidos en serie (chC12A3.2, chC13F12.1, chC11D5.3 y chA7D12.2, como se ha descrito en el Ejemplo 7) e IgG1 humana de control (HIgG1; Protos Immunoresearch, Burlingame, CA) a los pocillos que contenían las 35 líneas celulares y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Para una proporción de efector:diana de 25:1, se añadieron 50 µl de PBMC (500.000) y se incubaron durante cuatro horas más a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5 %. Las placas se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y se transfirieron 100 µl de sobrenadante a una placa de 96 micropocillos de fondo plano. El nivel de lisis celular se determinó midiendo la cantidad de lactato deshidrogenasa (Kit de detección de citotoxicidad (LDH), #11 644 793 001 Roche) liberada por las células lisadas. 40 Se añadieron 100 µl de la mezcla de reacción del kit LDH a 100 µl de sobrenadante durante hasta 30 minutos siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió a 490 nm. Los controles incluyeron células diana en solitario (liberación espontánea de LDH), células diana en solitario con Tritón X-100 al 2 % en diluyente de ensayo (liberación máxima de LDH), células efectoras con y sin células diana, y control de isotipo de IgG1 humana.

45 Resultados

Se utilizó la línea celular de plasmacitoma BCMA+ humano, U266, para ensayar la capacidad de los anticuerpos anti-BCMA quiméricos de eliminar a través de ADCC. Se usaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como células efectoras. Como se muestra en la Tabla 5, los mAb quiméricos C12A3.2 y C13F12.1 50 demostraron una actividad ADCC marcada con respecto a los controles de HIgG1. Los clones quiméricos A7D12.2 y C11D5.3 también mediaron la ADCC, aunque en menor medida que C12A3.2 y C13F12.1.

Tabla 5. ADCC de las células U266 mediante mAb anti-BCMA humano

Clon de mAb	% de eliminación a 1 nM	% de eliminación máxima (concentración de mAb, nM)
chC12A3.2	32	35 (4)
chC13F12.1	20	20 (0.4)
chA7D12.2	10	24 (100)
chC11D5.3	18	≥42 (≥100) ¹
¹ La determinación de eliminación máxima está incompleta		

Los ensayos de ADCC también se realizaron usando una segunda línea celular de plasmacitoma BCMA+, JJN-3, como células diana. Como se muestra en la Tabla 6, C12A3.2, C13F12.1 y A7D12.2 quiméricos también mediaron la ADCC de las células JJN-3.

Tabla 6. ADCC de las células JJN-3 mediante mAb anti-BCMA humano

Clon de mAb	% de eliminación a 1 nM	% de eliminación máxima (concentración de mAb, nM)
chC12A3.2	5	14 (100)
chC13F12.1	3	≥14 (≥100) ¹
chA7D12.2	20	37 (100)
¹ La determinación de eliminación máxima está incompleta		

El uso de células NK humanas enriquecidas como células efectoras no dio como resultado una mejora de la eliminación de chC12A3.2, chC13F12.1 o chA7D12.2. Por el contrario, el porcentaje de eliminación mediante las NK disminuyó con respecto a las PBMC, lo que indica que las células NK no son las células efectoras para chC12A3.2, chC13F12.1 o chA7D12.2 en los ensayos de ADCC con U266 y JJN3 como células diana (no se muestran los datos). La generación de variantes de afucosilo de chC12A3.2, chC13F12.1 o chA7D12.2 no mejoró la actividad de estos mAb (no se muestran los datos).

Ejemplo 9. Agotamiento celular mediado por anti-BCMA *in vivo*

Establecimiento de ratones humanizados (HSC/NSG)

Los ratones HSC/NSG proporcionan una herramienta útil para ensayar los reactivos biológicos *in vivo* específicos para dianas proteicas humanas, debido a que su sistema inmunológico consiste en tipos celulares humanos en funcionamiento (Brehm y col. (2010), Clin Immunol [publicación electrónica previa a la impresión]). Los ratones humanizados se generaron como se ha descrito previamente (Pearson y col. (2008), Curr Protoc Immunol Capítulo 15: Unidad 15.21. PMID: 18491294). Los ratones deficientes para la cadena gamma NOD/SCID/comunes (ratones NSG) se adquirieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones se mantuvieron y se criaron en condiciones libres de patógenos específicos en jaulas aislantes. Se establecieron los pares de cría y las madres se controlaron para estudiar el embarazo y el parto. Los cachorros de entre 2 y 6 días de edad se utilizaron para crear ratones humanizados. Los cachorros se irradiaron ligeramente con una dosis de 1 Gy (100 rad) de un irradiador de 137C. Los cachorros se inyectaron inmediatamente por vía intraorbital con aproximadamente 50.000 células madre humanas CD34+CD3 (HSC) obtenidas de sangre del cordón umbilical (All Cell LLC, adquiridas en StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canadá) y después se devolvieron a las madres. Los cachorros se destetaron a los 21 días y se colocaron en jaulas con otros ratones según el sexo. Desde los 3 meses de edad, los ratones se desangraron a través de la vena facial en tubos con heparina y la sangre se analizó mediante citometría de flujo para detectar la presencia de células humanas. En resumen, se tiñeron 100 µl de sangre con un cóctel de mAb, CD45-FITC anti-humano, CD3-PE anti-humano, CD19-PerCp anti-humano y CD45-APC anti-ratón (BD Biosciences, San Jose, California). Los ratones se consideraron exitosamente humanizados si tenían al menos un 20 % de células CD45+ humanas en la sangre, de las cuales el 10 % o más eran CD3+ humanas y el resto eran linfocitos B humanos y otras células hematopoyéticas humanas. Los ratones se desangraron y se analizaron ocasionalmente para asegurarse de que la humanización era estable, y se analizaron de forma rutinaria 2 semanas antes de ingresar en el estudio.

Citometría de flujo

Para identificar las células plasmáticas (PC) en ratones NSG humanizados con células madre humanas (HSC/NSG), los bazo digeridos con colagenasa se sometieron a un análisis por citometría de flujo. Las células se incubaron con un cóctel de mAb dirigido a un linaje de células humanas y a marcadores de linfocitos B humanas. El panel consistía en CD45 anti-humano, CD19 anti-humano, CD27 anti-humano, IgD anti-humano y CD38 anti-humano. Dos

marcadores utilizados para excluir poblaciones celulares específicas fueron CD45 anti-ratón y CD3 anti-humano. Las células identificadas como PC fueron CD45+ humanas, CD19+ humanas, CD3- humanas, CD27+ humanas, IgD- humana y CD38bright humanas. Para identificar linfocitos BCMA+, se utilizaron los mAb BCMA anti-humano conjugados con biotina C12A3.2 y A7D12.2.

5

Ensayo de agotamiento celular *in vivo*

Los ratones HSC/NSG de 5-6 meses de edad recibieron mAb anti-BCMA quiméricos i.p. Se usó IgG1 humana sin reactividad conocida (Protos Immunoresearch) como control negativo. Se recogió la sangre para preparar suero para el análisis de los niveles de isoforma de Ig humana. Al término del estudio, se extrajo el bazo, se preparó una única suspensión celular, se lisaron los RBC y las células se lavaron 3 veces con PBS/FCS al 5 % y se determinó la cantidad de células. Las células se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar las células del linaje T, las células del linaje B y las células plasmáticas.

15 Evaluación de isotipos de Ig humana en suero

Los niveles de IgM e IgG humana en suero se determinaron usando un formato ELISA (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX) y un kit de determinación de isotipos de inmunoglobulina humana (Millipore, Billerica, MA), respectivamente, de acuerdo con el protocolo del fabricante.

20

Resultados

El análisis de ratones HSC/NSG de 5-6 meses de edad reveló que, entre los diversos subconjuntos celulares evaluados, los linfocitos BCMA+ únicamente se encontraron en el linaje de linfocitos B. Dentro del linaje de linfocitos B, únicamente se encontró el BCMA en las PC esplénicas (CD19+ humanas, CD27+ humanas, IgD- y CD38 bright) (figura 4) y no en los linfocitos B sin tratar (CD19+ humanas, CD27- humanas e IgD+), los linfocitos B de memoria sin cambios (GD19+ humanas, CD27+ humanas e IgD+ humana) o los linfocitos B de memoria con cambios (CD19+ humanas, CD27+ humanas e IgD- humana) (no se muestran los datos).

30 Para evaluar la capacidad de los mAb quiméricos anti-BCMA humano para agotar las PC humanas, los ratones HSC/NSG recibieron diversas cantidades de los clones quiméricos anti-BCMA humano chACHD5.3, chC12A3.2, chC13F12.1 y chA7D12.2 (Ejemplo 7) dos veces por semana i.p. durante 2 semanas, después de lo cual se determinó la presencia de PC esplénicas. Las PC esplénicas del grupo de control tratado con HlgG1 se analizaron para determinar la expresión del BCMA usando los clones A7D12.2 y C12A3.2 y se confirmó que expresaban el BCMA de superficie celular (no se muestran los datos). Las PC se identificaron usando los parámetros citométricos de flujo descritos anteriormente, y las cantidades de células totales se determinaron a partir de los diagramas de puntos de citometría de flujo (calculadas como un porcentaje de la cantidad de células humanas totales). También se determinaron las cantidades de linfocitos B humanos sin tratar, linfocitos B humanos de memoria sin cambios y linfocitos B humanos de memoria con cambios.

40

El tratamiento con chC12A3.2 (N = 5) dio como resultado un descenso estadísticamente significativo, del 93 % y el 95 %, en la cantidad de PC esplénicas en los niveles de dosis de 200 µg y 20 µg, respectivamente, en comparación con los ratones tratados con HlgG de control (N = 5), mientras que la dosis de 2 µg también mostró un descenso marcado (32 %), aunque no fue estadísticamente significativo. El tratamiento con chC13F12.1 (N = 5) dio como resultado un descenso estadísticamente significativo, del 88 % y el 51 %, en la cantidad de PC esplénicas en los niveles de dosis de 200 µg y 20 µg, respectivamente (figura 5). No se observó ningún impacto en la cantidad de otros subconjuntos de linfocitos B o linfocitos T con chC12A3.2 y chC13F12.1 (no se muestran los datos).

50 El tratamiento con 200 µg de chC11D5.1 (N = 2) o chA7D12.2 (N = 1) dio como resultado una reducción del 89 % y el 97 %, respectivamente, en las PC humanas en el bazo, en comparación con los ratones de control tratados con HlgG (N = 5) (figura 6). El tratamiento con chA7D12.1 también dio como resultado un descenso de 2,6 veces en la cantidad de linfocitos B de memoria con cambios humanos esplénicos, en comparación con los ratones tratados con HlgG (575 frente a 217 PC/10⁵ células HuCD45⁺, para HlgG y chA7D12.1, respectivamente). Aunque no se pudo detectar BCMA en la superficie de linfocitos B de memoria con cambios en ratones humanizados sin tratar, parece 55 que mientras que el nivel de BCMA se encontraba por debajo del límite de detección mediante citometría de flujo, era suficiente para dar como resultado la eliminación mediada por Ab.

Para determinar el impacto del agotamiento de PC humanas en los niveles de Ig humana en suero en los ratones HSC/NSG descritos anteriormente, se analizaron subconjuntos de Ig humana. Los mAb anti-BCMA quiméricos

utilizados en estos estudios fueron de la isoforma de IgG1 humana, por lo tanto, los niveles de IgG1 humana no se pudieron evaluar de forma exacta. En algunas cohortes experimentales, los ratones tratados con control tuvieron cantidades variables y muy pequeñas de los isotipos de IgG1, IgG2, IgA e IgE (no se muestran los datos). Como se muestra en la Tabla 7, tanto chC12A3.2 como chC13F12.1 dieron como resultado reducciones marcadas de la IgM humana en suero, especialmente en los niveles de dosis más elevados. C12A3.2 quimérico dio como resultado una reducción del 63 %, 62 % y 30 % de la IgM para los niveles de dosis de 200, 20 y 2 µg, respectivamente. C13F12.1 quimérico dio como resultado una reducción del 52 %, 42 % y 32 % de la IgM para los niveles de dosis de 200, 20 y 2 µg, respectivamente.

10

Tabla 7. Niveles de IgM humana en suero (µg/ml)

Dosis de tratamiento (µg)	Tratamiento					
	chC12A3.2		chC13F12.1		IgG1 humana	
	Media	DE ¹	Media	DE	Media	DE
200	70,2 ¹	37,4	91,1 ³	26,5	190,6	67,3
20	73,0 ²	32,2	110,3 ⁴	47,3	NR ⁵	
2	134,3	60,1	128,9	112,4	NR	

¹DE = desviación estándar; ²p = 0,008; ³p = 0,02; ⁴p = 0,05; ⁵NR = no realizado

En un experimento separado, los ratones recibieron chC12A3.2 (N = 14) o control de HlgG1 (N = 9), y los ratones de control tuvieron isotipos de IgG2 e IgG3 fácilmente detectables, así como de IgM. Los ratones tratados con C12A3.2 quimérico presentaron un agotamiento significativo de células plasmáticas esplénicas similar al observado en la figura 5 (no se muestran los datos). Como se muestra en la Tabla 8, los ratones que recibieron chC12A3.2 presentaron niveles de IgG2 e IgM en suero significativamente reducidos en comparación con los ratones de control tratados con HlgG. Los ratones tratados con C12A3.2 quimérico también tuvieron una reducción marcada de la IgG3 en suero, aunque la diferencia no alcanzó una importancia estadística en comparación con los ratones de control (Tabla 8).

20

Tabla 8. Niveles de inmunoglobulina humana en suero

Tratamiento	Inmunoglobulina en suero (µg/ml)					
	IgG2		IgG3		IgM	
	Media	EE ¹	Media	EE	Media	EE
chC 12A3.2	5,4 ²	1,9	1,1	0,7	40,5 ³	12,2
HlgG	19,2	7,6	6,9	4,1	114,3	19,1

¹EE = error estándar; ²p = 0,05; ³p = 0,003

Las realizaciones en la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de las realizaciones de la invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En la medida en que el material incorporado por referencia se contradiga o no sea coherente con esta memoria descriptiva, la memoria descriptiva suplantarán cualquiera de tal material. La mención de cualquier referencia en el presente documento no constituye una admisión de que tales referencias sean técnica anterior de la presente invención.

A menos que se indique lo contrario, se debe comprender que todas las cifras que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción y otras utilizadas en la memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, se encuentran modificadas en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busque obtener mediante la presente invención. En última instancia, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debería interpretar a la luz de la cantidad de dígitos significativos y enfoques de redondeo normales.

A menos que se indique lo contrario, se debe comprender que el término "al menos" que precede a una serie de elementos hace referencia a cada elemento en la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando solamente la experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes estén incluidos en las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

45 <110> BIOGEN IDEC MA INC.

<120> ANTICUERPOS ANTI-BCMA

<130> 8201.108-304

5

<140> Aún no asignado

<141> 10 de marzo de 2010

<150> 61/162.924

10 <151> 24-03-2009

<150> 61/158.942

<151> 10-03-2009

15 <160> 47

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

25

```

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

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

30 <213> Mus musculus

<400> 2

ES 2 593 583 T9

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

<210> 3
 <211> 117
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 111
 15 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 593 583 T9

<400> 4

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

5 <210> 5
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 5

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

15 <210> 6
 <211> 111
 <212> PRT

ES 2 593 583 T9

<213> Mus musculus

<400> 6

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

5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 7

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

15

ES 2 593 583 T9

<210> 8
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 8

```

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

Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
 20          25          30

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

Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
 50          55          60

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

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

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100         105         110
  
```

<210> 9
 10 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 593 583 T9

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10 15

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

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
 35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
 50 55 60

Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
 85 90 95

Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
 100 105 110

Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
 115 120 125

Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
 130 135 140

Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
 145 150 155 160

Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
 165 170 175

Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
 180

<210> 10

<211> 282

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Val Thr Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr
 1 5 10 15

Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser
 20 25 30

Ser Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val

10

ES 2 593 583 T9

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

<210> 12
 <211> 111
 5 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 12

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

10

<210> 13
 <211> 451
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

20 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

ES 2 593 583 T9

<400> 13

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

ES 2 593 583 T9

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly
 450

- 5 <210> 14
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 593 583 T9

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

5

<400> 14

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

10 <210> 15
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

ES 2 593 583 T9

<400> 15

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

ES 2 593 583 T9

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

ES 2 593 583 T9

<211> 218
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 16

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

<210> 17
 15 <211> 218

ES 2 593 583 T9

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 17

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

10 <210> 18
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

ES 2 593 583 T9

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

5 <400> 18

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

ES 2 593 583 T9

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

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

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

<210> 19

<211> 218

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 19

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

Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
 20 25 30

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

Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

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

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

ES 2 593 583 T9

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 20

<211> 446

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 20

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Val Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Phe Phe Cys
 85 90 95

Ser Asn Asp Tyr Leu Tyr Ser Cys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

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

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

ES 2 593 583 T9

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

ES 2 593 583 T9

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

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

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

<210> 21

<211> 218

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 21

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

Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
20 25 30

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

Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

ES 2 593 583 T9

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 22

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 22

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

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

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

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95

Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

15 <210> 23

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 23

ES 2 593 583 T9

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

<210> 24

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 24

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

15

<210> 25

<211> 117

<212> PRT

ES 2 593 583 T9

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 25

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

10 <210> 26

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 26

20 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

ES 2 593 583 T9

85

90

95

Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 28

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

15 <210> 29

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 29

ES 2 593 583 T9

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

<210> 30
 <211> 112
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 30

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

15
 <210> 31

ES 2 593 583 T9

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 31

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

10

<210> 32
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

20

<400> 32

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

ES 2 593 583 T9

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

<210> 33

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 33

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

15 <210> 34

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 593 583 T9

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 34

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

5

<210> 35

<211> 117

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

15

<400> 35

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg His Tyr
 20 25 30

ES 2 593 583 T9

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

<210> 36

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 36

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

15

<210> 37

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

ES 2 593 583 T9

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

5 <400> 37

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

<210> 38

<211> 117

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 38

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg His Tyr

ES 2 593 583 T9

20 25 30

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

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

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

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ser Asn Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 39

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

Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
 20 25 30

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

15

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

ES 2 593 583 T9

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 40

```

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

Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
          20           25           30

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

Arg Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Ile Pro Ala
 50           55           60

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

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

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
          100          105          110
    
```

10 <210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 41

```

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

Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
          20           25           30

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

20

ES 2 593 583 T9

Arg Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 42

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 42

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

Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
20 25 30

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

Arg Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

15 <210> 43

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 43

ES 2 593 583 T9

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

<210> 44

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 44

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

ES 2 593 583 T9

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asn Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 45

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

15 <210> 46

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 46

ES 2 593 583 T9

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

<210> 47

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 47

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

ES 2 593 583 T9

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

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

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

Ser Asn Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al polipéptido de la SEQ ID NO: 9, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:
- 5
- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 31-35 de la SEQ ID NO: 3, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 50-66 de la SEQ ID NO: 3, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 99-106 de la SEQ ID NO: 3; y un dominio variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 24-38 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 11 o 12, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 54-60 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 11 o 12, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 93-101 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 11 o 12;
- 10
- b) un dominio variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 31-35 de la SEQ ID NO: 5, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 50-66 de la SEQ ID NO: 5, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 99-106 de la SEQ ID NO: 5; y un dominio variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 24-38 de la SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 54-60 de la SEQ ID NO: 6, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 93-101 de la SEQ ID NO: 6; o
- 15
- c) un dominio variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 31-35 de la SEQ ID NO: 7, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 50-66 de la SEQ ID NO: 7, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 99-106 de la SEQ ID NO: 7; y un dominio variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 que comprende los aminoácidos 24-38 de la SEQ ID NO: 8, una región CDR2 que comprende los aminoácidos 54-60 de la SEQ ID NO: 8, y una región CDR3 que comprende los aminoácidos 93-101 de la SEQ ID NO: 8.
- 20
- 25
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:
- 30
- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12;
- b) un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4;
- 35
- c) un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 11;
- d) un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6; o
- e) un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 8.
- 40
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:
- 45
- a) una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 17;
- b) una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 18 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 19; o
- c) una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 20 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 21.
- 50
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:
- 55
- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 25-29 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 22-24;
- b) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 34-38 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada entre la SEQ ID

NO: 30-33; o

c) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 43-47 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 39-42.

5

5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

10

a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 25-29 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 22-24;

b) un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 34-38 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 30-33; o

15

c) un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 43-47 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 39-42.

6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o de cadena sencilla.

20

7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

8.

Un polipéptido que se une a la SEQ ID NO: 9 y comprende la porción de unión a antígeno, el fragmento Fab, o el fragmento F(ab')₂ del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

25

9. Un hibridoma que produce el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

10.

Una composición farmacéutica que comprende:

30

a) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-7; o

b) el polipéptido de la reivindicación 8.

11.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con linfocitos B.

35

12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso como en la reivindicación 11, en el que el trastorno relacionado con linfocitos B es plasmacitoma, linfoma de Hodgkin, linfomas foliculares, linfomas de células pequeñas no escindidas, linfoma endémico de Burkitt, linfoma esporádico de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma extranodal de tejido linfoide asociado con mucosa, linfoma nodal de linfocitos B monocitoides, linfoma esplénico, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma de células mezcladas difusas, linfoma inmunoblástico, linfoma primario mediastinal de linfocitos B, linfoma angiocéntrico de linfocitos B pulmonares, linfoma linfocítico pequeño, proliferaciones de linfocitos B con un potencial maligno incierto, granulomatosis linfomatoide, trastorno linfoproliferativo postrasplante, un trastorno inmunorregulador, artritis reumatoide, miastenia gravis, púrpura trombocitopenia idiopática, síndrome anti-fosfolípido, enfermedad de Chagas, enfermedad de Grave, granulomatosis de Wegener, poli-artritis nodosa, síndrome de Sjogren, pénfigo vulgar, escleroderma, esclerosis múltiple, síndrome anti-fosfolípido, vasculitis asociada a ANCA, enfermedad de Goodpasture, enfermedad de Kawasaki, anemia hemolítica autoinmune y glomerulonefritis rápidamente progresiva, como enfermedad de las cadenas pesadas, amiloidosis primaria o asociada a inmunocitos, o gammapatía monoclonal de importancia indeterminada.

50

13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso como en la reivindicación 12, en el que el trastorno relacionado con linfocitos B es

a) una neoplasia de linfocitos B, tal como una neoplasia de células plasmáticas;

b) una enfermedad autoinmune;

55

c) púrpura trombocitopenia idiopática;

d) miastenia gravis; o

e) anemia hemolítica autoinmune.

14.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso como en la reivindicación 13, en el que la

neoplasia de células plasmáticas es mieloma múltiple.

15. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso como en la reivindicación 13, en el que la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide.

5

16. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso como en la reivindicación 11 o 12, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se administra junto con RITUXAN™.

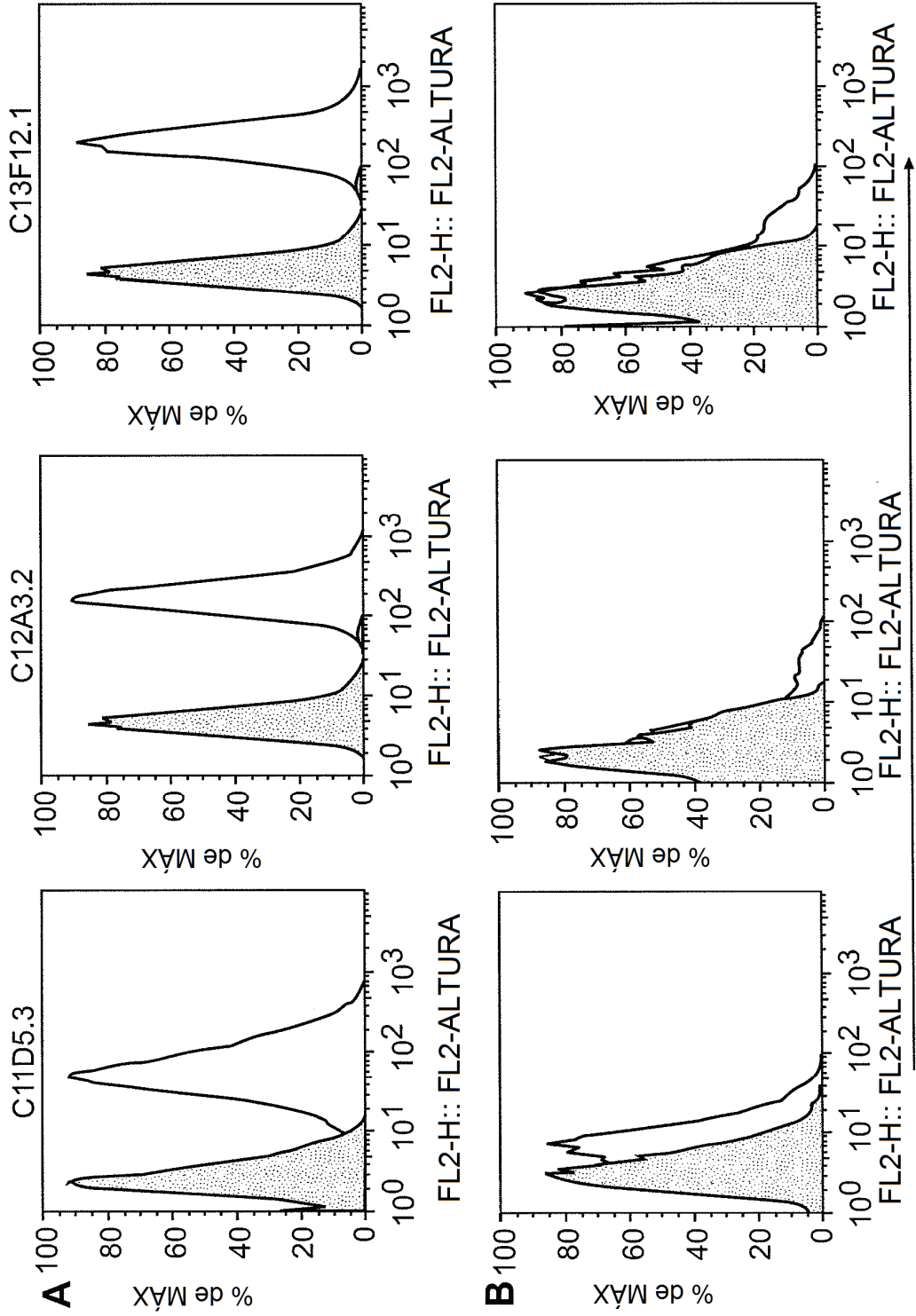


FIG. 1A

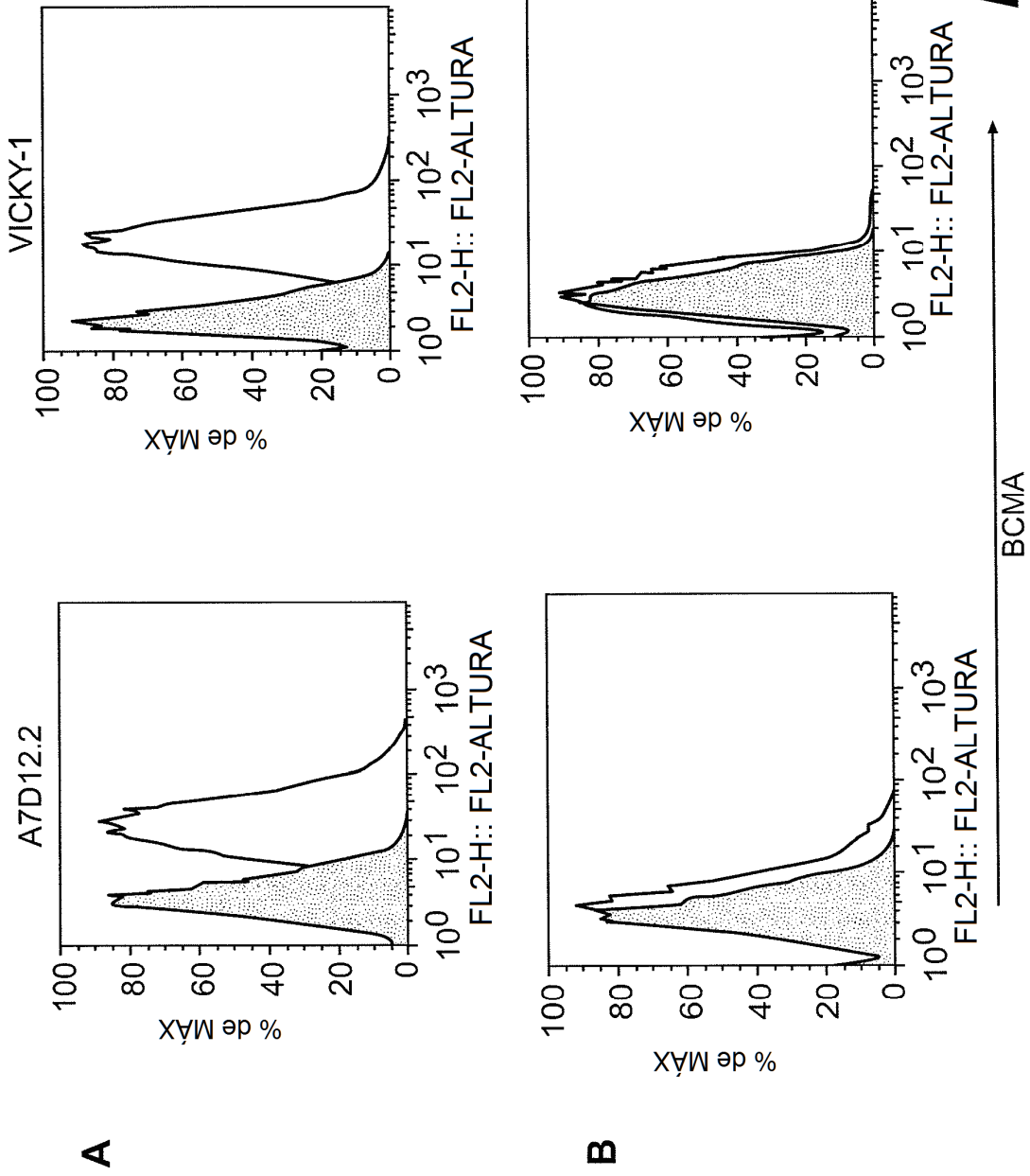


FIG. 1B

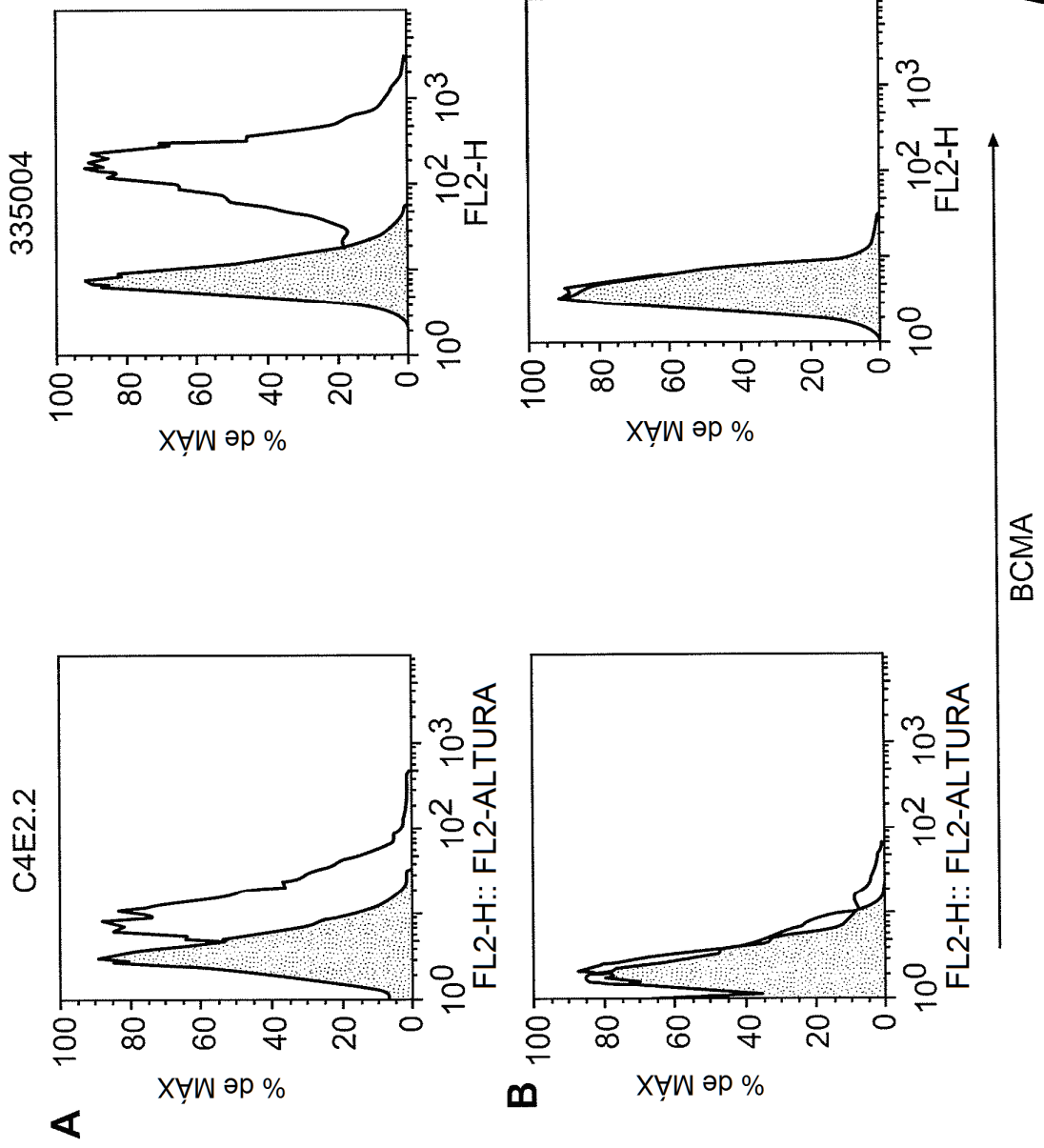


FIG. 1C

C11D5.3

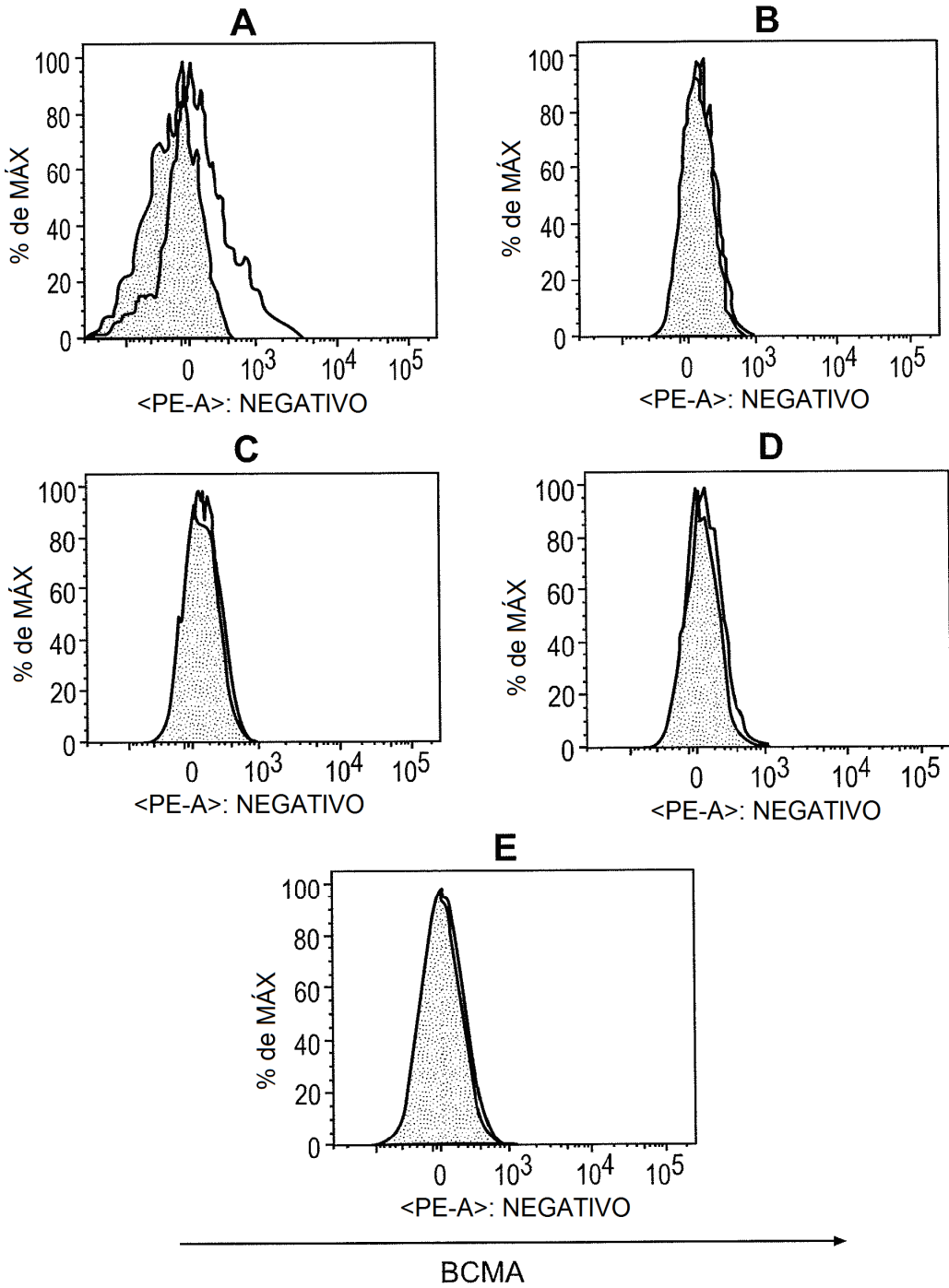
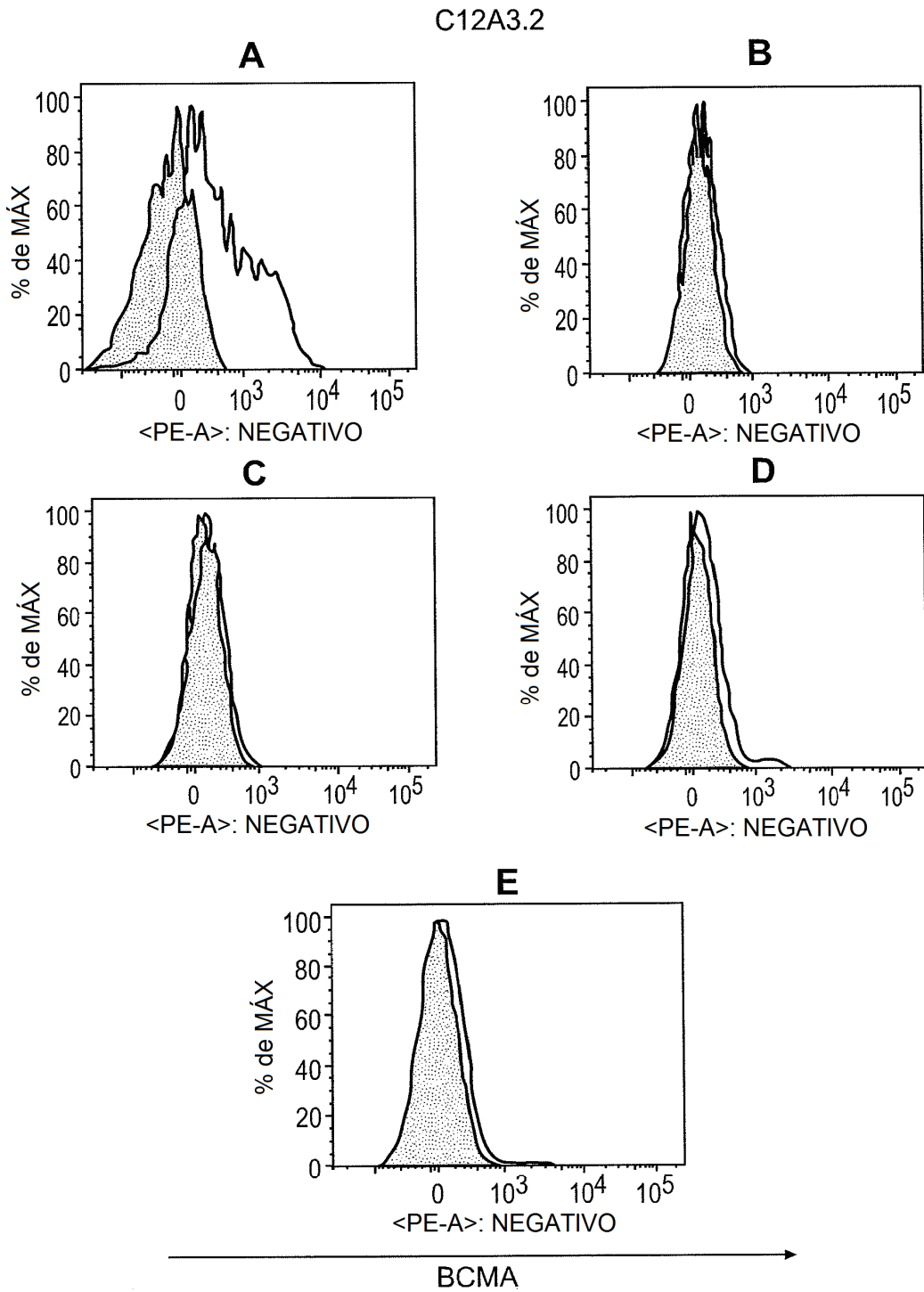


FIG. 2A



C13F12.1

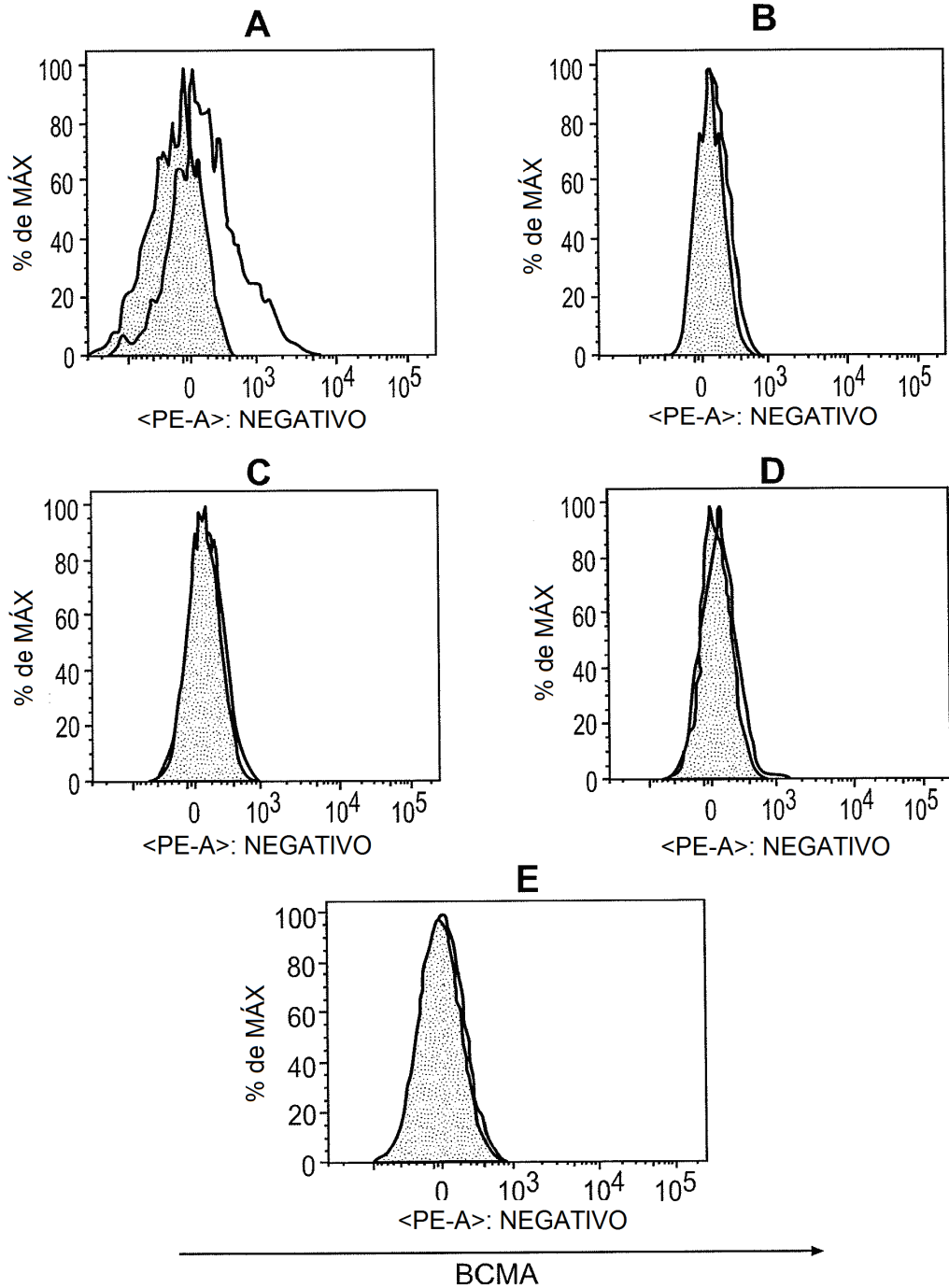


FIG. 2C

A7D12.2

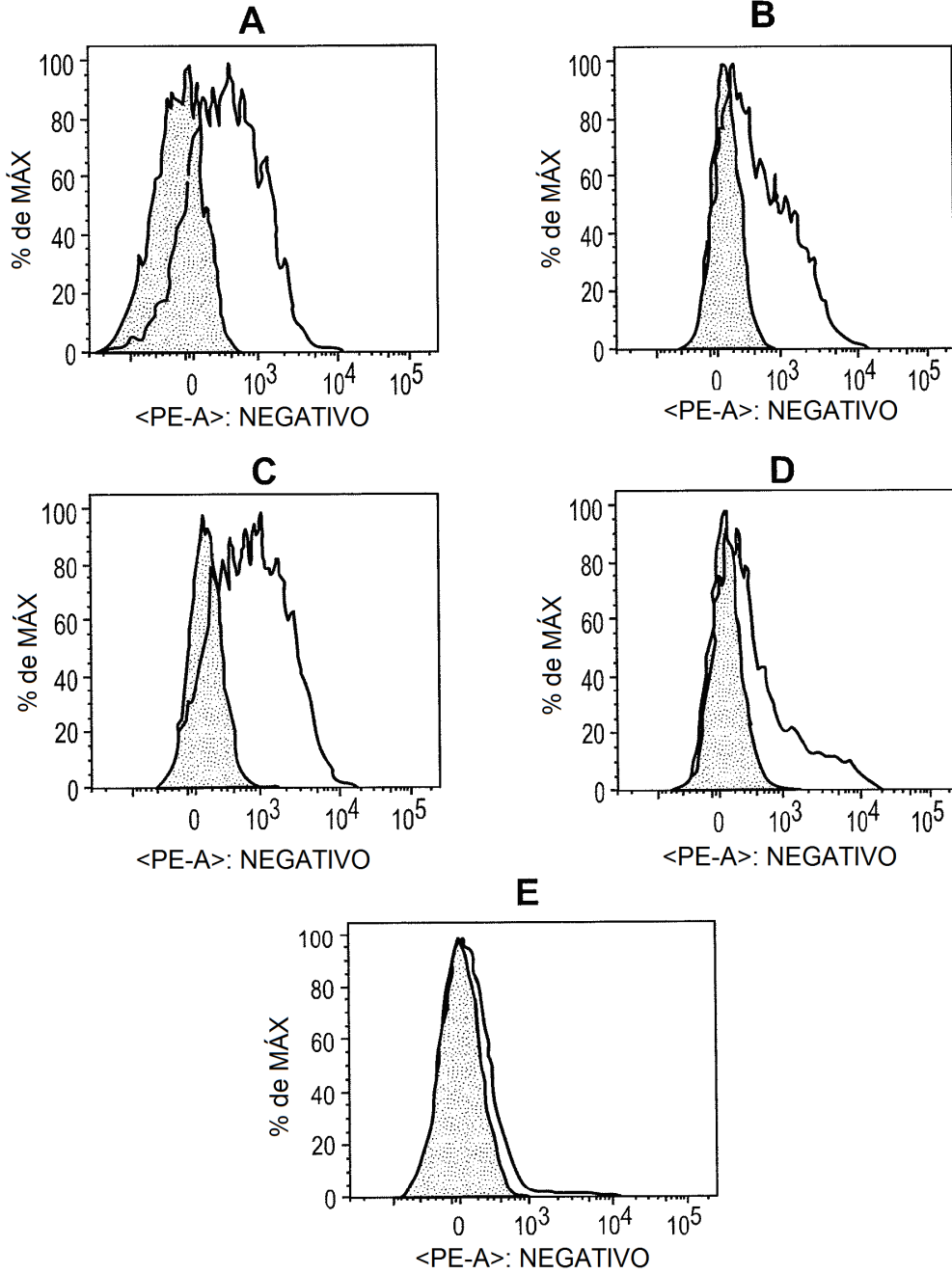


FIG. 2D

VICKY-1

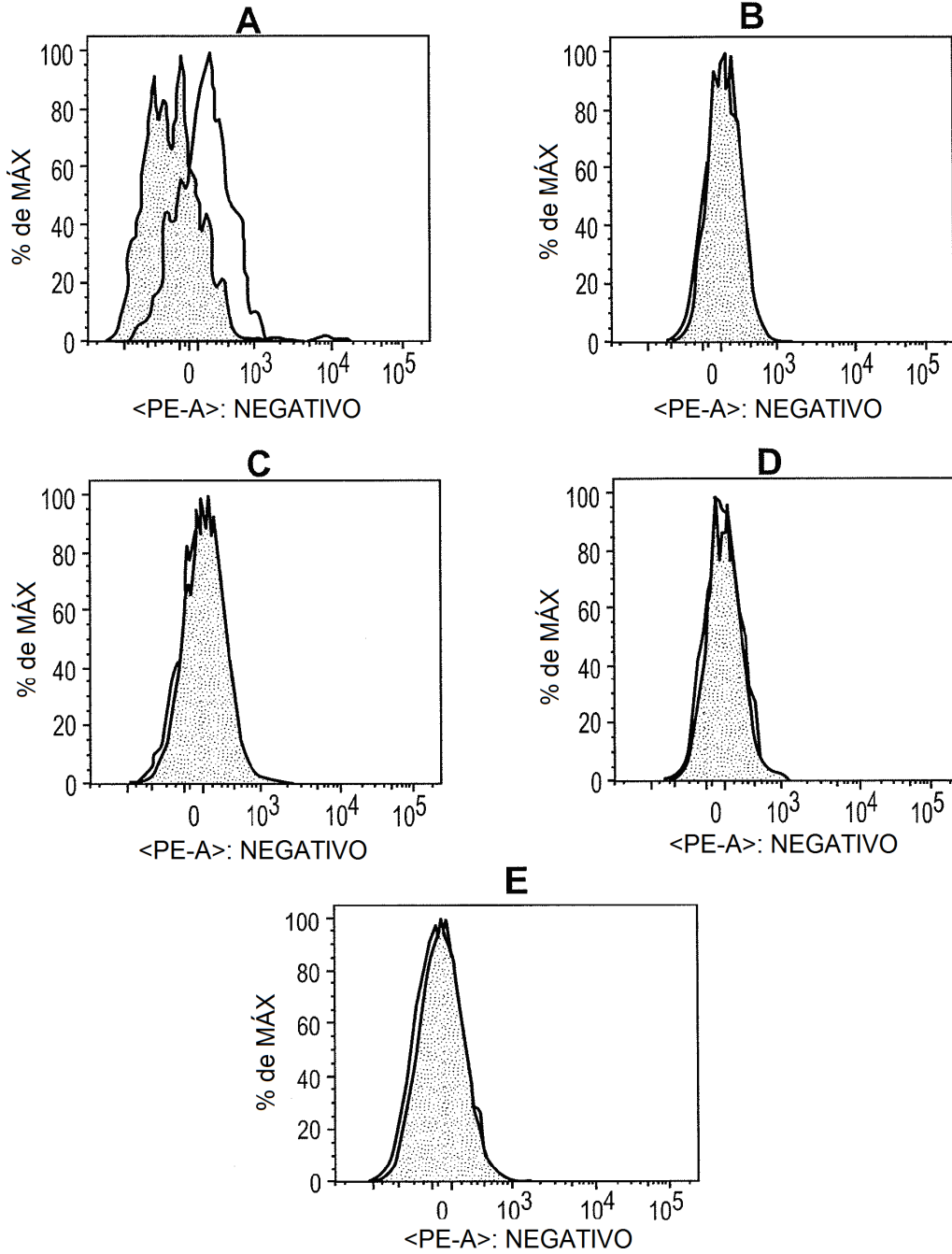


FIG. 2E

C4E2.2

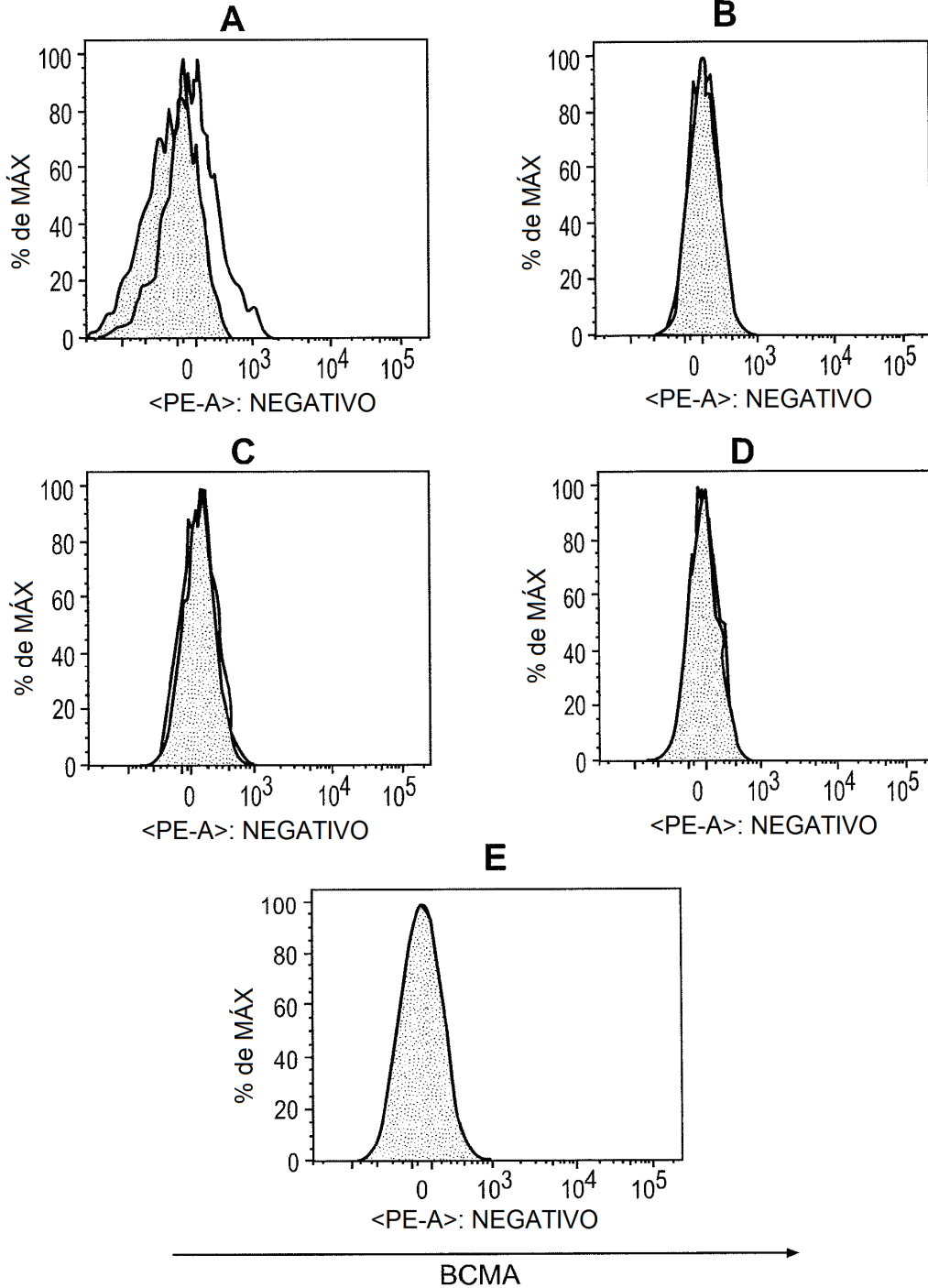


FIG. 2F

VOLUNTARIO SANO

C12A3.2

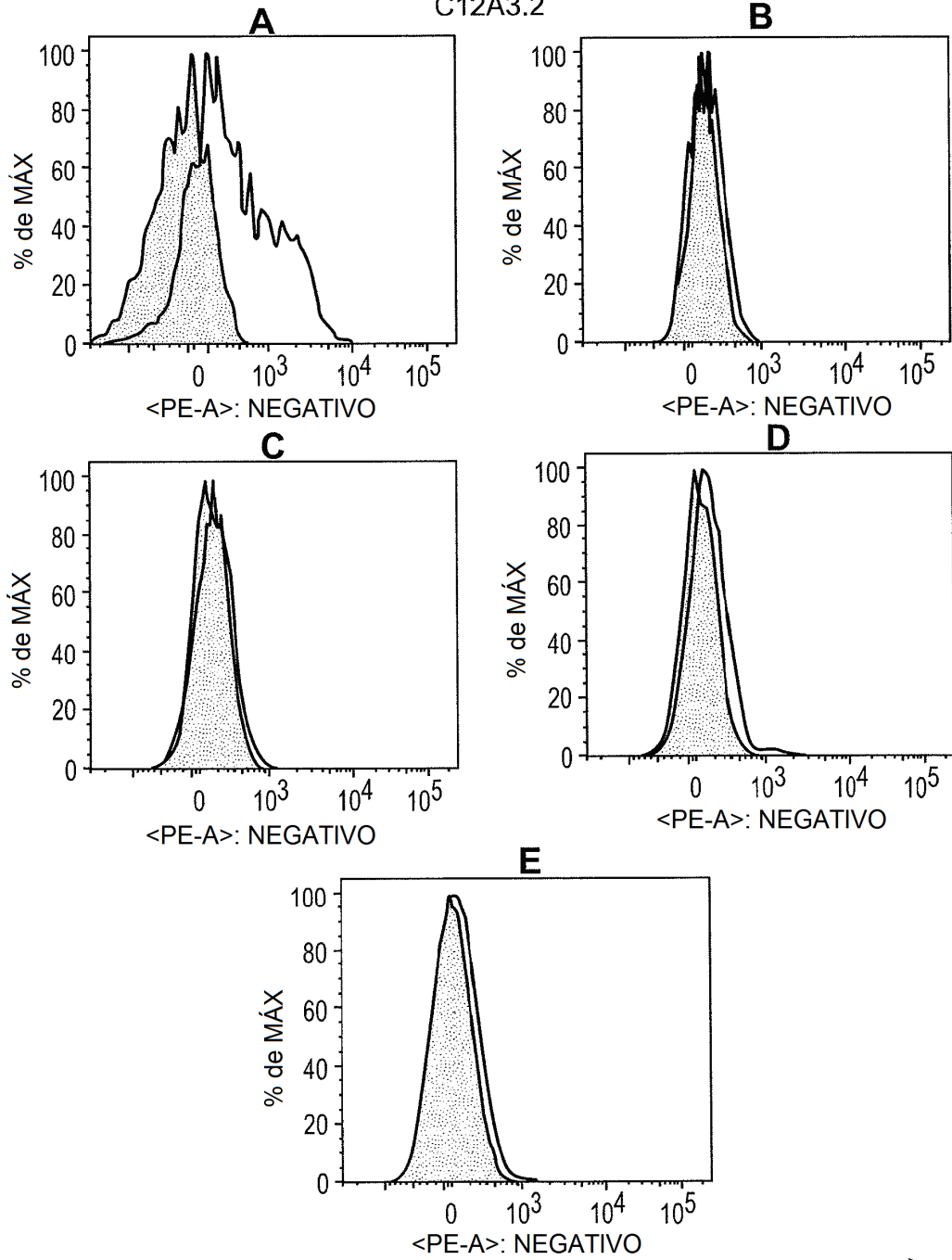


FIG. 3A

VOLUNTARIO SANO

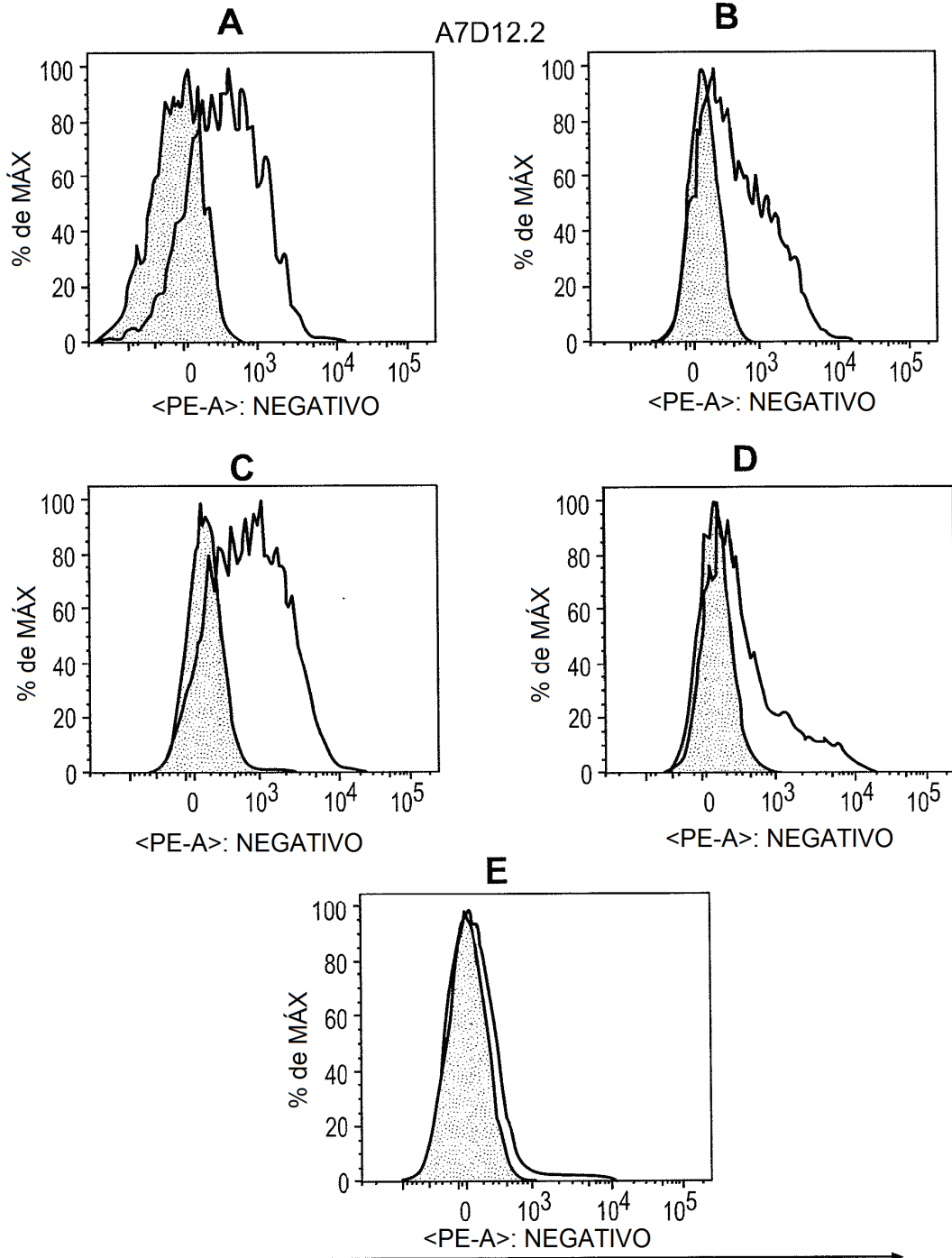
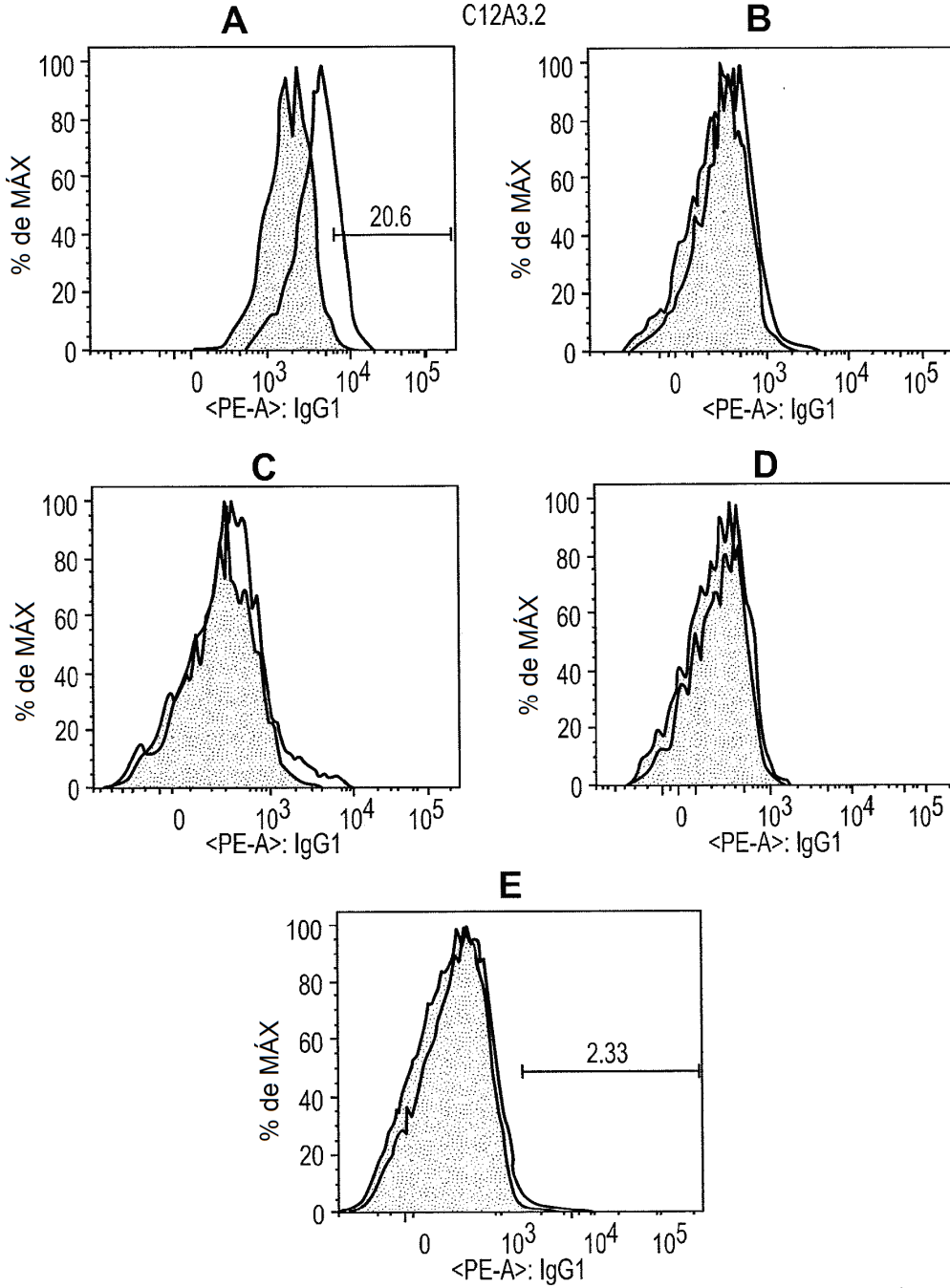


FIG. 3B

PACIENTE CON SLE



BCMA

FIG. 3C

PACIENTE CON SLE

A7D12.2

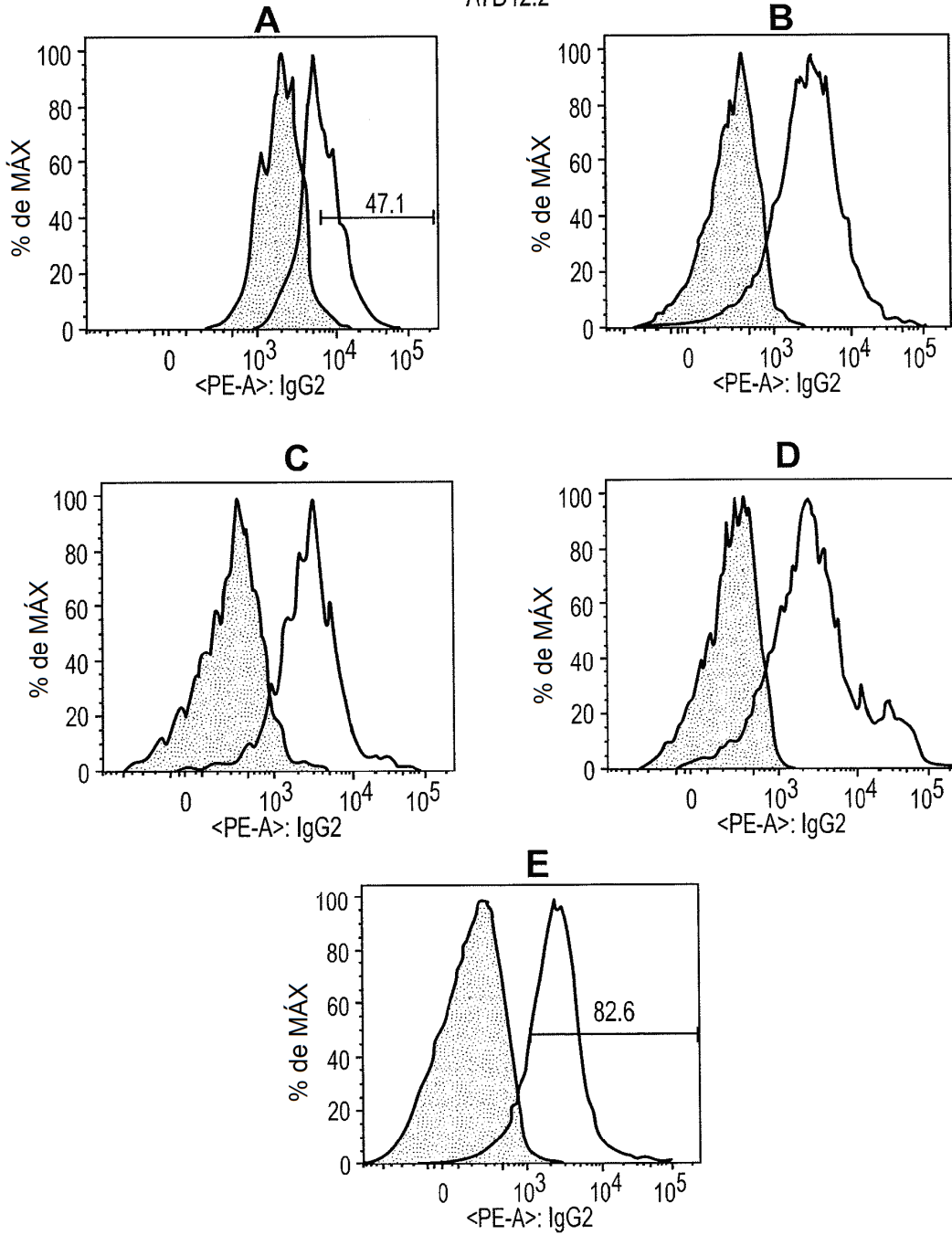


FIG. 3D

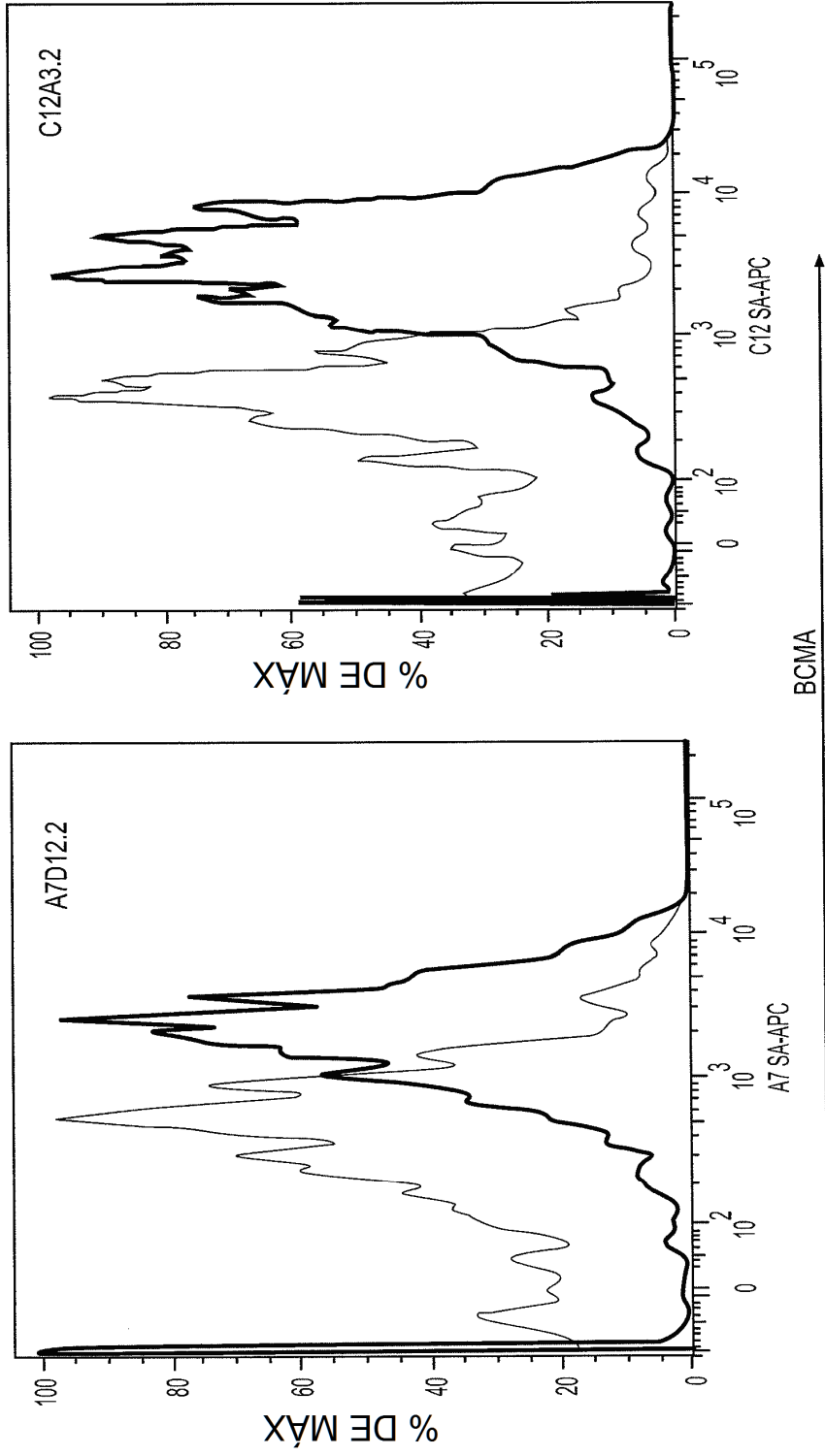


FIG. 4

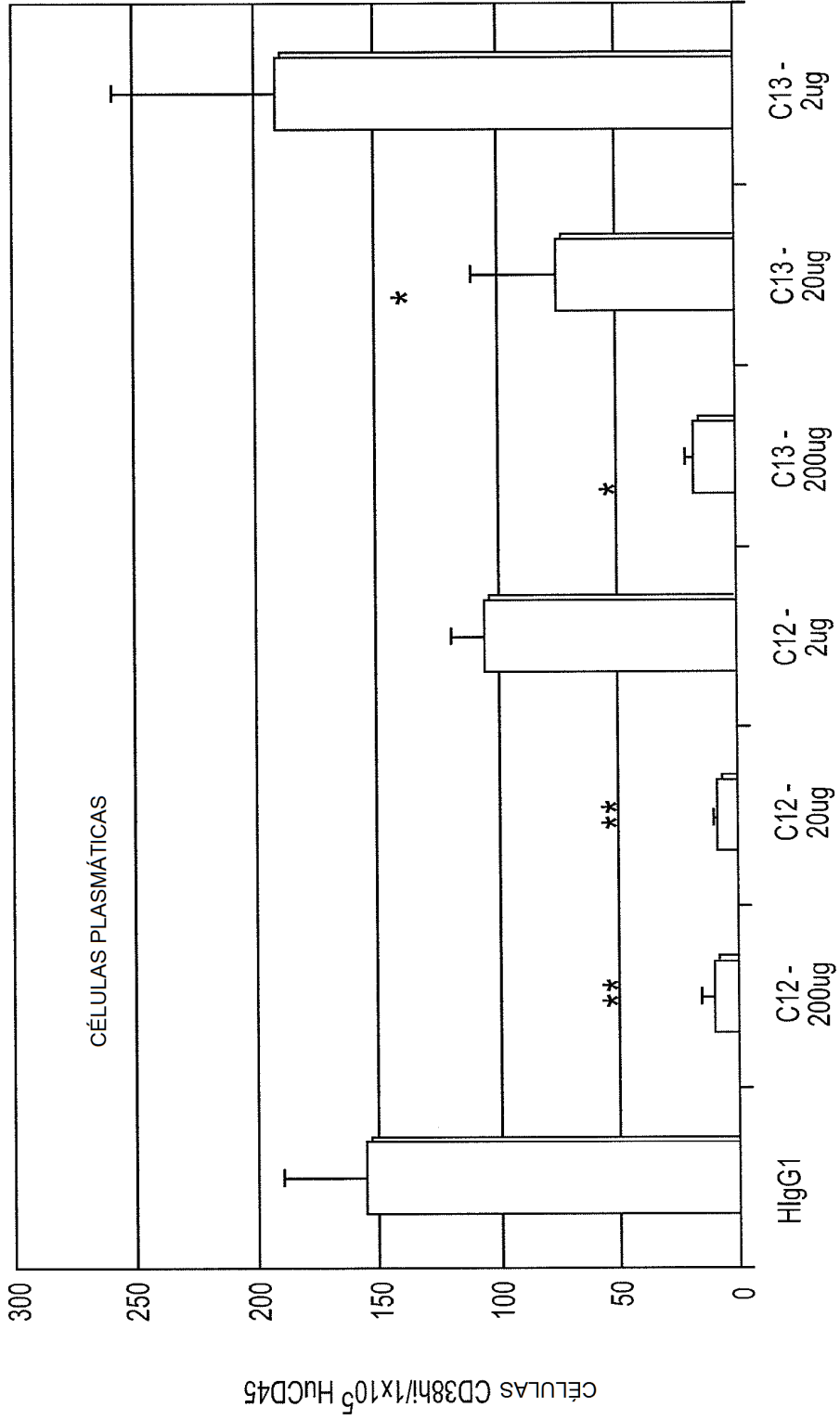


FIG. 5

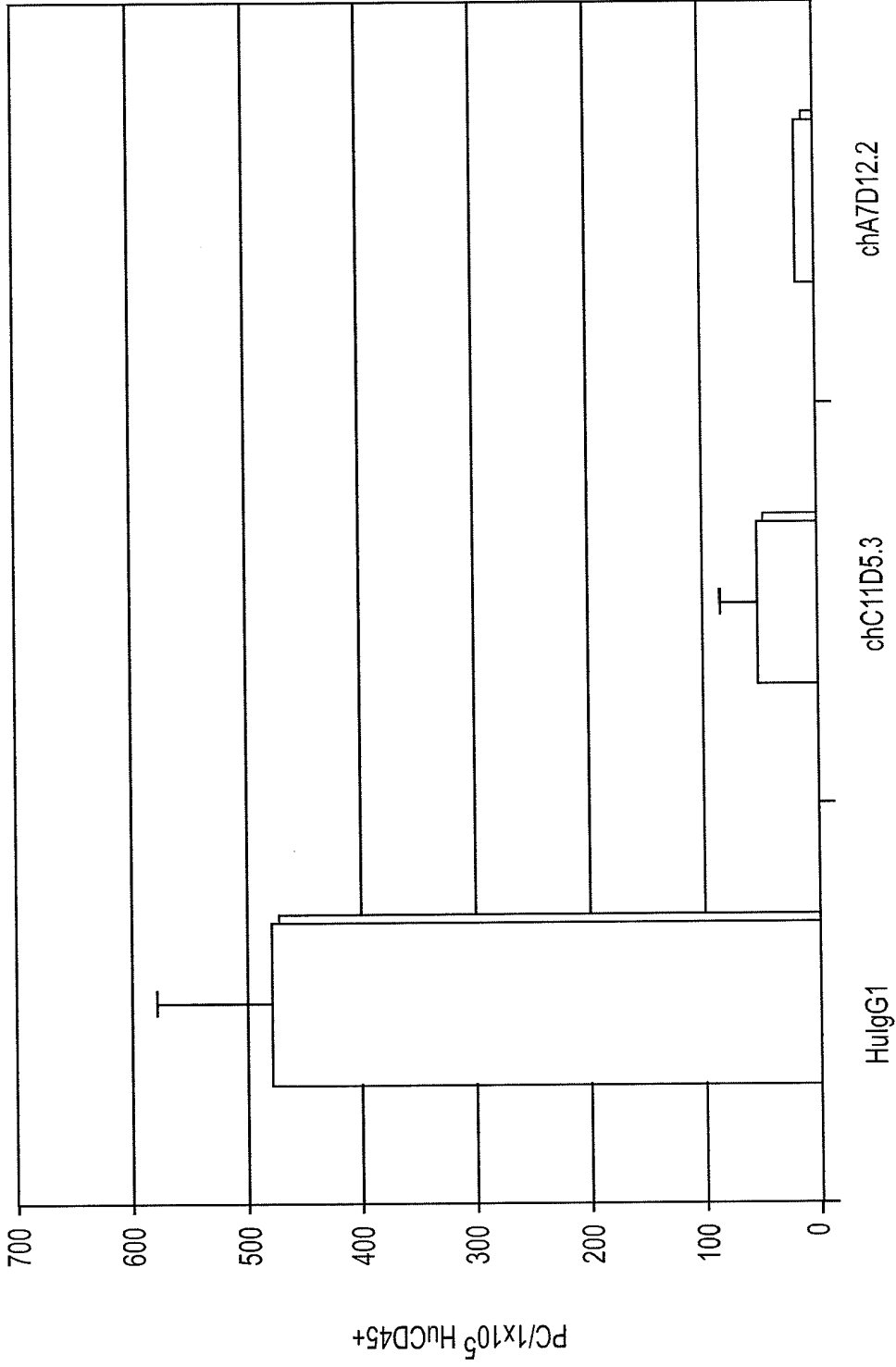


FIG. 6