(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 605 014**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2011 PCT/EP2011/067339**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12045752**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2011 E 11764553 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2625201**

(54) Título: **Agentes de unión a CD33**

(30) Prioridad:

04.10.2010 EP 10186468

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

KONOPITZKY, RENATE;
BORGES, ERIC;
ADAM, PAUL y
HEIDER, KARL-HEINZ

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Agentes de unión a CD33

Campo de la invención

La presente invención se refiere a inmunoterapias que están basadas en la disminución del número de células mieloides. En particular, la presente invención se refiere a agentes de unión a CD33 para su uso en dichas terapias, por ejemplo para el tratamiento de malignidades de células mieloides y el síndrome mielodisplásico (MDS).

Antecedentes de la invención

A principios de los años 80, el CD33 se identificó como un marcador de leucemias mieloides (Andrews et al., Blood, 62, 24-132,1983). El CD33 es un antígeno de la superficie celular que se expresa de modo específico sobre células mieloides, incluyendo células de leucemia mieloide. Es el miembro más pequeño de la familia SIGLEC (lecitinas relacionadas con Ig de unión al ácido siálico). El CD33 se expresa en células progenitoras hematopoyéticas de múltiples linajes tempranas y en precursores mielomonocíticos. Está ausente de células precursoras hematopoyéticas pluripotenciales (Andrews et al., Journal of Experimental Medicine, 169, 1721-1731, 1989). Está infrarregulado sobre granulocitos maduros pero se mantiene sobre macrófagos, monocitos y células dendríticas (Andrews et al., Blood, 62, 24-132,1983). Además de las células mielomonocíticas, también se ha descubierto que el CD33 se expresa sobre células cebadas y basófilos sanguíneos humanos (Valent et al., Blood, 15, 73(7):1778-85, 1989). Se emplean anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD33 para el diagnóstico de la leucemia, así como para el transporte dirigido terapéutico y la purgación *in vitro* de médula ósea para el transplante autólogo en la leucemia mieloide aguda (AML) (Duzkale et al., Biol. Blood Marrow Transplant, 9(6):364-372, 2003). Los esfuerzos iniciales en el transporte dirigido terapéutico se centraron en el desarrollo de inmunotoxinas empleando un anticuerpo anti-CD33 conjugado con la toxina ricina. Puesto que el CD33 se internaliza con rapidez después de la unión del anticuerpo (Audran et al., J. Immunol. Methods., 188(1):147-154,1995), el enfoque de la inmunotoxina era obvio.

El CD33 es una glicoproteína transmembrana de 67 KD. El dominio extracelular de unión al ácido siálico de CD33 está implicado en la adhesión de célula a célula. Los motivos inhibidores basados en tirosina del inmunorreceptor intracelular (ITIM) confieren señales inhibidoras a la célula, afectando a la proliferación y a la supervivencia celular. La vías reales de señalización del CD33 no están bien comprendidas pero se supone que implican al ITIM y a motivos similares a ITIM y al reclutamiento de tirosina fosfatasas (von Gunten et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1143: 61–82, 2008). Se ha definido un ortólogo de CD33 murino pero se ha cuestionado su comparabilidad funcional con el CD33 humano (Brinkman-Van der Linden et al., Mol. Cell. Biol., 23(12): 4199-4206, 2003). El papel functional del CD33 humano en leucocitos humanos y malignos sigue siendo desconocido.

Varias publicaciones han descrito al CD33 como un marcador de la superficie celular estable sobre células de AML y CML primarias expresado por 70-100% de los pacientes ensayados (Plesa et al., Cancer, 112(3), 572-580, 2007; Hauswirt et al., Eur. J. Clin. Invest., enero, 73-82, 2007; Scheinberg et al., Leukemia, vol. 3, 440-445, 1989). El CD33 se expresa sobre células blásticas mieloides malignas, que representan la mayoría de las células malignas en la sangre periférica y en la médula ósea de pacientes con leucemia, y sobre células precursores leucémicas, un número relativamente pequeño de células menos diferenciadas en la médula ósea que se caracterizan por su capacidad para la autorrenovación y el mantenimiento de la jerarquía clonal leucémica. Se considera la disminución del número de células precursoras leucémicas como un mecanismo clave para una supervivencia sostenida sin tumores. La inmunotoxina dirigida a CD33 Mylotarg®, un anticuerpo IgG_4 humanizado conjugado con la toxina calicheamicina, se emplea para el tratamiento de pacientes con AML mediante el transporte de su carga útil tóxica a células de AML positivas a CD33 (Amadori et al., Cancer Treat. Rev., 34(1):49-60, 2008). El lintuzumab (SGN-33, HuM195), , véase, p.ej. Caron et al., Cancer Research 52:24, 6761-6767, 1992) un anticuerpo monoclonal humanizado específico de CD33 “desnudo”, se evaluó en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de AML y MDS con señales clínicas iniciales de eficacia procedentes de un estudio de escalada de dosis de fase I, y se han indicado acontecimientos adversos tolerables (Raza et al., resumen nº 983, 14th EHA Congress, 4-7 de junio, 2009).

El transporte dirigido a líneas celulares de AML con HuM195 específico de CD33 *in vitro* reduce la secreción inducida por TNF-α de citoquinas inflamatorias, tales como IL-8, MCP-1 y RANTES (Sutherland et al., Mabs, 1:5, 481-490, 2009). La importancia de este efecto para la terapia de la AML es desconocida, pero la modulación del medio de citoquinas del microentorno del tumor puede contribuir a la eficacia terapéutica del anticuerpo. Además, el anticuerpo induce una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y una fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) de líneas celulares de AML *in vitro* (Sutherland et al., Mabs, 1:5, 481-490, 2009). Se considera que la ADCC es un mecanismo decisivo para la actividad antitumoral de anticuerpos en malignidades hematológicas. Los datos de ensayos clínicos con el anticuerpo monoclonal específico de CD20 rituximab han demostrado la importancia de los mecanismos mediados por células efectoras para el tratamiento de malignidades de células B con respecto a la respuesta a un tratamiento con anticuerpos (Weng y Levy, J. Clin. Oncol., 21 (21): 3940-3947, 2003).

En conclusión, se ha demostrado que el antígeno CD33 se expresa sobre células normales del linaje

mielomonocítico y con frecuencia se expresa sobre células tumorales en leucemias mieloides. En un ensayo de fase I con un anticuerpo contra CD33 (lintuzumab) se observaron las primeras señales de eficacia sin graves efectos adversos. Sin embargo, el desarrollo clínico del lintuzumab se detuvo después de los resultados de un ensayo de fase II en combinación con quimioterapia, que no produjeron la mejora esperada en la eficacia. Por tanto, existe una necesidad clara de desarrollar modalidades de tratamiento mejoradas dirigidas a CD33.

En vista de la técnica anterior, es necesario proporcionar una terapia aún mejor para las malignidades de células mieloides y MDS, en particular para la leucemia mieloide aguda.

En particular, es necesario proporcionar agentes de unión antagonistas aún mejores para CD33 para tratar el cáncer, en particular la AML.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos agentes de unión a CD33 que se unen al CD33 humano y que se definen porque:

a)tienen una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR4, CDR5 y CDR6, en los que CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:1-14, CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:14-28, CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:29-42, CDR4 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:43-56, CDR5 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:57-70, CDR6 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:71-84, o

b)reconocen un epitopo dentro de la secuencia de aminoácidos FFHPIPYYDKNSPVHGYW (SEQ ID NO:141) del CD33 humano.

La presente invención proporciona además agentes de unión a CD33, en los que la cinética de internalización de los agentes de unión a CD33 es tal que al menos 30%, preferiblemente 40% de la cantidad inicial del anticuerpo permanece sobre la superficie celular de células HL60 a las 4 horas después de la incubación.

La presente invención proporciona además agentes de unión a CD33, en los que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:85-98, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:99-112.

La presente invención proporciona además agentes de unión a CD33, en los que la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:113-126, y la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:127-140.

La presente invención proporciona además agentes de unión a CD33 que tienen mutaciones en el dominio F_c que aumentan la ADCC.

Otras realizaciones preferidas se indican en la siguiente memoria descriptiva y en las reivindicaciones.

Se ha descubierto que los agentes de unión a CD33 según la presente invención tienen una alta afinidad por el CD33 humano y además tienen una cinética de internalización favorable, que se caracteriza por una larga presencia de los agentes de unión a CD33 cuando están unidos al CD33 sobre la superficie de las células diana, lo cual se traduce en una actividad ADCC favorable.

Los inventores también han descubierto que los agentes de unión a CD33 según la presente invención se unen a un epitopo diferente del dominio extracelular de CD33 comparados con el lintuzumab. Sin querer limitarse por ninguna teoría concreta, se cree que ésta es la razón de la diferente cinética de internalización de los agentes de unión a CD33 según la presente invención y el lintuzumab.

Descripción de las figuras

Las figuras 1-3 muestran la internalización de ejemplos de agentes de unión a CD33 según la invención, en comparación con el lintuzumab en células HL60.

La figura 4 muestra la velocidad de internalización en células HL60 de dos ejemplos de anticuerpos según la invención, en comparación con el lintuzumab.

La figura 5 muestra la actuación de ADCC en células HL60 de dos ejemplos de anticuerpos según la invención, en comparación con el lintuzumab.

Descripción detallada de la invención

Agentes de unión a CD33

La expresión "agente de unión", tal como se emplea en la presente, significa una proteína o un péptido que se une de modo específico con un antígeno diana. Un agente de unión puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un derivado de dicho anticuerpo, u otro agente que se une de modo específico al antígeno diana. Un agente de unión también puede ser una proteína que comprende una región Fv o una porción de ésta (por ejemplo, una V_H o V_L o uno o más CDR de un anticuerpo que se une de modo específico al antígeno diana). En una realización preferida en la presente, el agente de unión es un anticuerpo.

La expresión "agente de unión a CD33", tal como se emplea en la presente, se refiere a un agente de unión que se une de modo específico al CD33, generalmente a una porción del dominio extracelular del CD33 humano.

El término "anticuerpo", tal como se emplea en la presente, se refiere a (a) polipéptidos de inmunoglobulinas y prociones inmunológicamente activas de los polipéptidos de inmunoglobulinas (es decir, polipéptidos de la familia de las inmunoglobulinas o sus fragmentos, que contienen un sitio de unión al antígeno que se une de modo inmunoespecífico a un antígeno diana específico); o (b) derivados sustituidos de modo conservativo de dichos polipéptidos de inmunoglobulinas o sus fragmentos que se unen de modo inmunoespecífico al antígeno diana. Los anticuerpos se describen en general por ejemplo en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoespecíficos intactos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) intactos, y fragmentos de anticuerpos que muestren la actividad biológica deseada (por ejemplo, de unión al antígeno). El anticuerpo puede ser de cualquier tipo o clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2), preferiblemente de clase IgG, más preferiblemente una IgG1.

Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende una región variable de unión al antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera y los dominios constantes de cadena pesada, según sea apropiado para la clase de anticuerpo. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o sus variantes de secuencia de aminoácidos.
Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo, incluyendo la región variable o de unión al antígeno, o una porción de éstas. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv, fragmentos de unión al antígeno de V_H y V_L, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos monocatenarios, scFv, scFv-Fc, un SMTP, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de un fragmento o de fragmentos de anticuerpos.

La “región variable de cadena pesada” o “V_H” significa la parte de la cadena pesada que comprende la CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones de marco circundantes.

La “región variable de cadena ligera” o “V_L” significa la parte de la ligera que comprende la CDR4, CDR5 y CDR6, y las regiones de marco circundantes.

Una “CDR” significa las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera, que determinan la especificidad de unión/complementariedad de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo. El orden de las CDR en la presente solicitud es simplemente numérico.

Un “epitopo” significa en la presente una parte de un antígeno, que es reconocida por un anticuerpo o por un fragmento de anticuerpo. En particular, este término se refiere a partes del CD33, que pueden ser reconocidas por un anticuerpo.

En la presente se emplea “mAb” para referirise a los anticuerpos monoclonales.

Un anticuerpo puede tener una o más "funciones efectoras", que se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc con la secuencia nativa o un variante de secuencia de aminoácidos de la región Fc) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la unión a CIq; la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; la infrarregulación de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en los que dichos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Los polipéptidos de Fv también comprenden generalmente un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L. que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para un informe sobre scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore, *eds*., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).
Un agente de unión, tal como un anticuerpo, que "se dirige a," "que se une a" o que "se une de modo específico a" un antígeno de interés (es decir, un antígeno diana) es aquel capaz de unirse al antígeno con una afinidad suficiente de forma que el agente de unión es útil para dirigirse a una célula que expresa el antígeno. Generalmente, el agente

de unión se une con una afinidad de al menos aproximadamente 1 x 10^7 M^{-1}, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

Un "derivado de anticuerpo", tal como se emplea en la presente, se refiere a un anticuerpo, tal como se definió anteriormente, que se modifica mediante una unión covalente a una molécula heteróloga tal como, por ejemplo, mediante la unión a un polipéptido heterólogo, o mediante glicosilación, desglicosilación, acetilación o fosforilación, u otra modificación que normalmente no está asociada con el anticuerpo. En algunas realizaciones, la molécula heteróloga no es un agente terapéutico. En algunas realizaciones, la molécula heteróloga no muestra un efecto citostático ni citotóxico en sí misma.

Una referencia más exhaustiva de todos los términos, expresiones y procedimientos utilizados en la presente es Sambrook at al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición (15 de enero, 2001).

Los agentes de unión a CD33 se unen de modo específico a un receptor, CD33, asociado a una población de células diana concreta. El CD33 es un miembro de la familia de sialoadhesión que se expresa sobre células del linaje hematopoyético, que incluyen precursores mieloides, monocitos, macrófagos, células dendríticas, y células cebadas. El CD33 también se expresa sobre células tumorales asociadas con enfermedades mieloproliferativas o proliferativas de células cebadas, incluyendo la leucemia mieloide aguda y los síndromes mieloplásicos, y sobre células precursoras leucémicas. Los anticuerpos que se dirigen a CD33 y sus usos se han descrito de modo general (véase, por ejemplo, Pierelli et al., 1993, *Br. J. Haematol.*, 84:24-30; Matutes et al., 1985, *Hemaiol.* Oncol., 3:179-186; Taussig et al., 2005, *Blood,* 106:4086-4092; Florian et al., 2006, *Leuk. & Lymph*., 47:207-222).

En algunas realizaciones, el agente de unión a CD33 es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal). Los anticuerpos monoclonales útiles pueden ser poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un CD33 (por ejemplo, el dominio extracelular del CD33 humano). Un anticuerpo monoclonal (mAb) puede prepararse utilizando cualquier técnica conocida en la técnica. Estas incluyen, pero no se limitan a la técnica de hibridomas descrita por primera vez por Köhler y Milstein (1975, *Nature,* 256:495- 497), la técnica de hibridomas de células B humanas (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today,* 4:72), y la técnica de EBV-hibridoma (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Estos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, e IgD, y de cualquier subclase de éstas. El hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal puede cultivarse in vitro o in vivo.

Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero no se limitan a anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricas, y los fragmentos de anticuerpo funcionalmente activos de cualquiera de éstos.

Los anticuerpos CD33 útiles incluyen los anticuerpos que pueden lograr un efecto terapéutico mediante diversos mecanismos conocidos en la técnica, tales como una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), una fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por ejemplo, el anticuerpo puede mediar en la ADCC interaccionando con células efectoras inmunológicas, tales como células NK, monocitos, y macrófagos.

Los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, comprenden porciones humanas y no humanas, que puede fabricarse utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales (véase, por ejemplo, Cabilly et al., patente de EEUU nº 4.816.567; y Boss et al., patente de EEUU nº 4.816.397; incorporándose ambas como referencia en su totalidad). Los “anticuerpos humanizados” son moléculas de anticuerpos procedentes de una especie no humana que tiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) procedentes de la especie no humana, y una región de marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Queen, patente de EEUU nº 5.585.089, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Estos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo utilizando los métodos descritos en la publicación internacional nº WO 87/02671 ; la publicación de patente europea nº 0184187; la publicación de patente europea nº 0171496; la publicación de patente europea nº 0173494; la publicación internacional nº WO 86/01533; la patente de EEUU nº 4.816.567; la publicación de patente europea nº 012023; Berter et al., 1988, Science, 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol., 139:3521-3526; Sun el al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer. Res., 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature, 314:446-449; Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst., 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science, 229:1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques, 4:214; la patente de EEUU nº 5.225.539; Jones et al., 1986, Nature, 321:552-525; Verhoeyan et al., 1988, Science, 239:1534; y Beidler et al., 1988, J. Immunol., 141:4053-4060: Los anticuerpos monoclonales humanos pueden producirse mediante cualquiera de numerosas técnicas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Teng el al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72-79; Olsson at al., 1982, Meth. Enzymol., 92:3-16; y las patentes de EEUU nº 5.939.598 y 5.770.429).

Los anticuerpos totalmente humanos pueden producirse utilizando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar los genes de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas endógenas, pero que pueden expresar

genes de la cadena pesada y ligera humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido de CD33. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse utilizando la tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humanos que portan los ratones transgénicos se redisponen durante la diferenciación de las células B, y después sufren una conmutación de clase y una mutación somática. Por tanto, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos véase, por ejemplo, Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol., 13:65-93). Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos, y protocolos para producir dichos anticuerpos, veánse, por ejemplo, las patentes de EEUU nº 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; y 5.545.806. Otros anticuerpos humanos pueden obtenerse en el mercado, por ejemplo, en Medarex (Princeton, NJ), que se obtienen inmunizando ratones.

Los anticuerpos totalmente humanos que reconocen un epitopo seleccionado también puede generarse utilizando una técnica denominada "selección guiada". En esta estrategia, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo un anticuerpo de ratón, se emplea para guiar la selección de un anticuerpo totalmente humano que reconozca el mismo epitopo (véase, por ejemplo, Jespers et al., 1994, Biotechnology, 12:899-903). Los anticuerpos humanos también pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen los bancos de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581 ; Quan y Carter, 2002, The rise of monoclonal antibodies as therapeutics, en Anti-IgE and Allergic Disease, Jardieu y Fick Jr., eds., Marcel Dekker, Nueva York, NY, capítulo 20. pp. 427- 469).

Los fragmentos de anticuerpos útiles incluyen, pero no se limitan a fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fab', fragmentos Fab, Fv, anticuerpos monocatenarios (SCA) (por ejemplo, según se describe en la patente de EEUU nº 4.946.778; Bird, 1988, Science, 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883; y Ward et al., 1989, Nature, 334:544-54), scFv, scFv-Fc, FvdsFv, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, SMIP (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EEUU publicada nº 2005-0238646) y cualquier otra molécula que comprenda una o más CDR y que tenga la misma especificidad que el anticuerpo.

En otras realizaciones, el anticuerpo es una proteína de fusión de un anticuerpo, o su fragmento funcionalmente activo, unida a otra proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo puede condensarse a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico) en el N-terminal o el C-terminal, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o su porción, generalmente una porción de al menos 10, 20 ó 50 aminoácidos de la proteína) que no sea el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o su fragmento puede unirse de modo covalente a la otra proteína en el C-terminal del dominio variable o un dominio constante.

Los anticuerpos pueden modificarse, por ejemplo mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula con la condición de que dicha unión covalente permita al anticuerpo mantener su inmunoespecificidad de unión al antígeno. Por ejemplo, un derivado de un anticuerpo puede ser aquel que se ha modificado aún más, por ejemplo mediante glicosilación, desglicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, desrealización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, ruptura proteolítica, enlace a otra proteína, etc. Puede realizarse cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, pero no se limitan a ruptura química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina o similares. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

En realizaciones específicas, puede resultar deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EEUU nº 2006-0003412 y 2006-0008882). Pueden prepararse variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis peptídica. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de deleciones, inserciones y/o sustituciones para conseguir la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambiando el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina," tal como se describe en Cunningham y Wells (Science, 244:1081-1085). En este caso, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (generalmente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Después se refinan las localizaciones de los aminoácidos que muestran sensibilidad funcional a las sustituciones mediante la introducción de variantes adicionales u otras variantes en los sitios de sustitución o para los sitios de sustitución. De esta manera, mientras que el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no necesita predeterminarse la naturaleza de la mutación per se. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza una mutagénesis de barrido de alanina o una mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se seleccionan los variantes de los anticuerpo expresados con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de uno solo o de múltiples restos aminoacídicos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal, o el anticuerpo condensado con un polipéptido citotóxico.

Otro tipo de anticuerpo es un variante de sustitución de aminoácidos de un anticuerpo. Estos variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula del anticuerpo reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en la región de marco.

Unas modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo pueden conseguirse mediante la selección de sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal, (b) de la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) del volumen de la cadena lateral. Los restos naturales se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófoba: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófila neutra: cys, ser, thr;

(3) ácida: asp, glu;

(4) básica: asn, gln, his, lys, arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromática: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas incluirán cambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Resulta deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, por ejemplo para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. En particular, la actividad ADCC puede potenciarse introduciendo mutaciones de aminoácidos en la región constante del anticuerpo (Lazar et al., PNAS, 103, 11, 4005-4010, 2006). Esto puede lograrse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo; véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EEUU publicada nº 2006-0160996. Como alternativa, o además, puede introducirse uno o más restos cisteína en la región Fc, permitiendo con ello la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener una mejor capacidad de internalización y/o una mayor CDC y ADCC (véase, por ejemplo, Caron et al., 1992, J. Exp. Med., 176:1191-1195; y Shopes, 1992, J. Immunol., 148:2918-2922.) Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada pueden también prepararse usando conectores cruzados heterobifuncionales, tal como se describe en Wolff et al., 1993, Cancer Research 53:2560-2565. Como alternativa, un anticuerpo puede modificarse para tener regiones Fc duales y, con ello, puede tener unas capacidades mejoradas de lisis del complemento y de ADCC (véase, por ejemplo, Stevenson et al., 1989, Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230).

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

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención son variantes de Fc con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 332 y/o 239 y/o 236. En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención tienen mutaciones en el dominio Fc seleccionadas del grupo de:

i) una única sustitución en la posición 332, preferiblemente I332E;

ii) una combinación de sustituciones en las posiciones 239 y 332, preferiblemente S239D/I332E;

iii) una combinación de sustituciones en las posiciones 236 y 332, preferiblemente G236A/I332E;

iv) una combinación de sustituciones en las posiciones 236, 239 y 332, preferiblemente G236A/S239D/I332E;

En este contexto, resulta particulamente preferido introducir mutaciones en el dominio F_c en una o más posiciones seleccionadas de los aminoácidos en las posiciones 332 y/o 239 y/o 236, según el índice de numeración de EU de Kabat. Se prefieren en particular las sustituciones en las posiciones 239 y 332, en especial S239D/I332E.

Los variantes de Fc en los anticuerpos de la presente invención se definen según las modificaciones de los aminoácidos que los componen. Así, por ejemplo, I332E es un variante de Fc con la sustitución I332E con relación al polipéptido de Fc de origen. De forma similar, S239D/I332E define un variante de Fc con las sustituciones S239D y I332E, y S239D/I332E/G236A define un variante de Fc con las sustituciones S239D, I332E, y G236A con relación al polipéptido de Fc de origen.

Para aumentar la semivida sérica del anticuerpo se puede incorporar un epitopo de unión al receptor de reciclaje en el anticuerpo (en especial un fragmento de anticuerpo), según se describe, por ejemplo, en la patente de EEUU nº 5.739.277. Tal como se emplea en la presente, la expresión "epítopo de unión al receptor de reciclaje" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4) que es responsable de aumentar la semivida sérica in vivo de la molécula de IgG.

Los anticuerpos pueden estar glicosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (véase, por ejemplo, Jefferis y Lund, 1997, Chem. Immunol., 65:111-128; Wright y Morrison, 1997, TibTECH, 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas pueden afectar a la función de la proteína (véase, por ejemplo, Boyd et al., 1996, Mol. Immunol., 32:1311 -1318; Wittwe y Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180), y a la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína que puede afectar a la conformación y a la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (véase, por ejemplo, Jefferis y Lund, supra; Wyss y Wagner, 1996, Current Opin. Biotech., 7:409-416). Los oligosacáridos también puede actuar para dirigir una glicoproteína concreta a ciertas moléculas basándose en sus estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha indicado que en una IgG galactosilada, el resto oligosacárido 'se voltea' hacia fuera del espacio inter-C_H2, y los restos N-acetilglucosamina terminales quedan disponibles para unirse a la proteína de unión a manosa (véase, por ejemplo, Malhotra et al., 1995, Nature Med., 1 :237-243). La eliminación mediante una glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo monoclonal IgG1 murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de los linfocitos humanos) producida en células de ovario de hámster chino (CHO) produce una reducción completa de la lisis mediada por el complemento (CMCL o CDC) (Boyd et al., 1996, Mol. Immunol., 32:131, 1-1318), mientras que la eliminación selectiva de los restos ácido siálico utilizando neuraminidasa no produce pérdida de CMCL. También se ha indicado que la glicosilación de anticuerpos afecta a la ADCC. En particular, se ha indicado que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de β(1.4)-N- acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisectado, tienen una mejor actividad ADCC (véase, por ejemplo, Umana et al., 1999, Nature Biotech., 17:176-180).

La glicosilación de los anticuerpos generalmente es una N-glicosilación o una O-glicosilación. La N-glicosilación se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La O-glicosilación se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, de modo más habitual serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Los variantes de glicosilación de los anticuerpos son variantes en los que el patrón de glicosilación del anticuerpo está alterado. La alteración significa delecionar uno o más restos carbohidrato del anticuerpo, añadir uno o más restos carbohidrato al anticuerpo, cambiar la composición de la glicosilación (es decir, el patrón de glicosilación), el grado de la glicosilación, o similares.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra de modo conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de N-glicosilación). La alteración también puede realizarse mediante la adición o la sustitución de uno o más restos serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de O-glicosilación). De manera similar, la eliminación de sitios de glicosilación puede lograrse mediante la alteración de aminoácidos dentro de los sitios de glicosilación nativos del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos se altera habitualmente alterando la secuencia del ácido nucleico subyacente. Estos métodos incluyen, aunque no se limitan al aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), una mutagénesis de PCR, o una mutagénesis de módulos de un variante preparado anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

La glicosilación (incluyendo el patrón de glicosilación) de los anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula hospedante utilizada para expresar el anticuerpo. Puesto que el tipo de célula utilizado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos, como producto terapéutico potencial en muy pocas ocasiones es la célula nativa, pueden esperarse variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse el al., 1997, Biol. Chem., 272:9062-9070.) Además de la elección de las células hospedantes, otros factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación del medio, la densidad del cultivo, la oxigenación, el pH, los

programas de purificación, y similares. Se han propuestos diversos métodos para alterar el patrón de glicosilación que se obtiene en un organismo hospedante concreto, que incluyen introducir o sobreexpresar ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU nº 5.047.335; 5.510.261; y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, puede eliminarse de forma enzimática de la glicoproteína, por ejemplo utilizando una endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula hospedante recombinante puede modificarse genéticamente, por ejemplo, hacer que sea defectuosa para procesar ciertos tipos de polisacáridos. Estas técnicas y otras similares son muy conocidas en la técnica.

La estructura de glicosilación de los anticuerpos puede analizarse con facilidad mediante técnicas convencionales de análisis de carbohidratos, incluyendo una cromatografía de lectina, RMN, espectrometría de masas, HPLC, GPC, análisis de la composición de monosacáridos, digestión enzimática secuencial, y HPAEC-PAD, que emplea una cromatografía de intercambio aniónico a pH alto para separar oligosacáridos basándose en la carga. También se conocen métodos para liberar los oligosacáridos para objetivos analíticos e incluyen, sin limitación, un tratamiento enzimático (realizado de modo habitual empleando péptido-N-glicosidasa F/endo-β-galactosidasa), la eliminación utilizando un entorno alcalino severo para liberar principalmente estructuras O-enlazadas, y métodos químicos que emplean la hidrazina anhidra para liberar los oligosacáridos N- y O-enlazados.

Los anticuerpos también pueden tener modificaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones o adiciones) en restos aminoácidos que interaccionan con receptores Fc. En particular, los anticuerpos pueden tener modificaciones en los restos aminoácidos identificados por su implicación en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 97/34631).

En su aspecto más amplio, la presente invención se refiere a agentes de unión a CD33 que se unen al CD33 humano, y que se definen porque:

a) tienen una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR4, CDR5 y CDR6, en los que CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:1-14, CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:15-28, CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:29-42, CDR4 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:43-56, CDR5 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:57-70, CDR6 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:71-84, o

b) reconocen un epitopo dentro de la secuencia de aminoácidos FFHPIPYYDKNSPVHGYW (SEQ ID NO:141) del CD33 humano.

La presente invención proporciona además agentes de unión a CD33, en los que la cinética de internalización de los agentes de unión a CD33 es tal que al menos 30% de la cantidad inicial del anticuerpo permanece sobre la superficie celular de células HL60 a las 4 horas después de la incubación.

Se ha descubierto que los agentes de unión a CD33 según la presente invención se unen a un epitopo diferente que el del lintuzumab (véase el ejemplo 4 en la presente). Ambos epitopos (SEQ ID NO:141 y SEQ ID NO:142) no se solapan. Se cree que los diferentes epitopos sobre el dominio extracelular del CD33, que son reconocidos por los agentes de unión a CD33 según la presente invención y por el lintuzumab, son la razón del distinto comportamiento de internalización y actuación de ADCC de los agentes de unión a CD33 según la presente invención y el lintuzumab (cf. los ejemplos 2 y 3 en la presente).

En una realización preferida, al menos 40% de la cantidad inicial de los agentes de unión a CD33 permanecen sobre la superficie celular a las 4 horas después de la incubación.

En una realización preferida, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:85-98, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:99-112.

En una realización preferida, el agente de unión a CD33 tiene una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:113-126, y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:127-140.

En una realización preferida, el agente de unión a CD33 tiene una afinidad por el CD33 humano y por el CD33 del macaco cangrejero con una K_D igual o menor que 10 nM.

En una realización preferida en la presente, el agente de unión a CD33 está humanizado.

En una realización preferida en la presente, el agente de unión a CD33 es totalmente humano.

En una realización preferida, el agente de unión a CD33 comprende también una función efectora.

En una realización preferida, la función efectora está mediada por un dominio F_c.

En una realización preferida, el agente de unión a CD33 comprende una o más mutaciones en el dominio F_c que

modulan la función del dominio F_c.

En una realización preferida, la modulación de la función del dominio F_c es un aumento de la ADCC en al menos 10%, preferiblemente 50% o 100%.

Los agentes de unión a CD33 particularmente preferidos según la presente invención se listan en la tabla 1:

Tabla 1

nº	Clon nº ID	SEQ ID CDR1	SEQ ID CDR2	SEQ ID CDR3	SEQ ID CDR4	SEQ ID CDR5	SEQ ID CDR6	SEQ ID V_H	SEQ ID V_L	SEQ ID cadena pesada	SEQ ID cadena ligera
1	280-03-08	1	15	29	43	57	71	85	99	113	127
2	280-21-09	2	16	30	44	58	72	86	100	114	128
3	280-29-12	3	17	31	45	59	73	87	101	115	129
4	280-31-01	4	18	32	46	60	74	88	102	116	130
5	280-31-01(mut)	5	19	33	47	61	75	89	103	117	131
6	280-34-02	6	20	34	48	62	76	90	104	118	132
7	280-50-01	7	21	35	49	63	77	91	105	119	133
8	280-50-01(mut)	8	22	36	50	64	78	92	106	120	134
9	280-61-07	9	23	37	51	65	79	93	107	121	135
10	283-03-03	10	24	38	52	66	80	94	108	122	136
11	283-05-01	11	25	39	53	67	81	95	109	123	137
12	283-07-03	12	26	40	54	68	82	96	110	124	138
13	283-11-03	13	27	41	55	69	83	97	111	125	139
14	283-14-01	14	28	42	56	70	84	98	112	126	140

Tratamiento del cáncer

Varias publicaciones han descrito al CD33 como marcador de la superficie celular principalmente sobre células AML y CML que se expresa sobre las células malignas del 70% al 100% de los pacientes (Scheinberg et al., 1989; Hauswirt et al., 2007; Plesa et al., 2007; Webber et al., 2008). El CD33 se expresa sobre células blásticas mieloides malignas, que representan la mayoría de las células malignas en la sangre periférica y en la médula ósea de pacientes con leucemia, y sobre células precursores leucémicas, un número relativamente pequeño de células menos diferenciadas en la médula ósea que se caracterizan por su capacidad para la autorrenovación y el mantenimiento de la jerarquía clonal leucémica. La viabilidad clínica del transporte dirigido al CD33 utilizando anticuerpos se ha demostrado con Mylotarg® (gemtuzumab ozogamizina), un conjugado de anticuerpo-calicheamicina que ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con AML en recaída no elegible para otras opciones de tratamiento. Una estrategia alternativa dirigida al CD33 es el desarrollo del lintuzumab (SGN-33, HuM195), un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado que ha demostrado señales tempranas de eficacia en ensayos clínicos de fase I (Raza et al., 2009). Tomados conjuntamente, existe una abundancia de datos preclínicos y clínicos que subrayan la importancia y la viabilidad del transporte dirigido a CD33 para el tratamiento de la AML y otras malignidades positivas a CD33.

La leucemia mieloide aguda (AML) es una malignidad del linaje mieloide de los leucocitos. Esta neoplasia hematológica es una enfermedad de la sangre y de la médula ósea que si se deja sin tratar generalmente resulta fatal en semanas a meses. Hay una frecuencia estimalda de 30000 casos de AML en EEUU y de 47000 en la Unión Europea (datos de frecuencia de 10 años confirmados por Mattson-Jack, 2010). La AML es la forma más frecuente de leucemia aguda en adultos (aproximadamente 90%), y comprende aproximadamente 33% de los nuevos casos

de leucemia. La edad media de los pacientes diagnosticados con AML es de 67 años. La AML es responsable de aproximadamente 1,2% de las muertes por cáncer en EEUU.

La AML provoca síntomas no específicos, tales como pérdida de peso, fatiga, fiebre, y sudores nocturnos. La AML se diagnostica mediante ensayos sanguíneos, estudio de la médula ósea, y ensayos de laboratorio para determinar el subtipo de AML y para determinar las decisiones de tratamiento.

La terapia para la AML depende en gran medida de la edad y el estado de actuación del paciente. Los pacientes que pueden tolerar una quimioterapia de inducción intensiva (y la posterior consolidación y mantenimiento) se tratarán intensamente con una combinación de fármacos citotóxicos. Es probable que estos pacientes logren una respuesta completa de aproximadamente 75%. En esta población de pacientes, el objetivo terapéutico es la curación. Aún así, se produce una recaída de la AML en aproximadamente la mitad de los pacientes en el año después de haber logrado una respuesta completa. Las proporciones de curación a largo plazo están en el radio del 30%.

Sin embargo, una edad avanzada en el momento del diagnóstico o la existencia de comorbilidades no permite la administración de la terapia de inducción intensiva, lo cual conduce a un objetivo de tratamiento paliativo. Por tanto, las proporciones de remisión disminuyen significativamente en pacientes más ancianos con AML. La mediana de la supervivencia en pacientes más ancianos con AML es menor que 6 meses.

En un aspecto, los agentes de unión a CD33 son útiles para tratar el cáncer, tal como retrasando el avance de un cáncer y/o reduciendo la caquexia asociada al cáncer, o previniendo o retrasando la recurrencia de una malignidad hematológica (por ejemplo, leucemia) en un mamífero, preferiblemente un paciente humano. El agente de unión a CD33 puede administrarse por sí solo o coadministrarse con otro agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente de unión a CD33 se coadministra con un producto quimioterapéutico según las normas asistenciales. El agente de unión a CD33 puede administrarse en forma no conjugada (es decir, no conjugado con una citotoxina) o como un conjugado.

En esta subsección, un "paciente" es un ser humano u otro mamífero que está sometiéndose a un tratamiento o que se le ha diagnosticado cáncer.

En algunas realizaciones, los agentes de unión a CD33 son útiles para retrasar el avance de un cáncer y/o para reducir la caquexia asociada a cáncer en un paciente, mediante la administración al paciente que lo necesite una dosificación eficaz del agente de unión a CD33. Sin querer limitarse a un mecanismo concreto, el agente de unión a CD33 se une a células efectoras o accesorias de los linajes mieloides o monocíticos (por ejemplo, monocitos, macrófagos, células dendríticas, y neutrófilos), inhibiendo o reduciendo con ello la producción de diversas citoquinas, quimioquinas y factores del crecimiento desde las células efectoras o accesorias y/o las células tumorales. Estas citoquinas, quimioquinas y factores del crecimiento, que pueden estimular el crecimiento y la proliferación de células tumorales y/o contribuir a la caquexia del cáncer, incluyen, pero no se limitan a interleuquina-1β (IL-1β), factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8), interferón-γ (IFN-γ), factor del credimiento endotelial vascular (VEGF), factor inhibidor de leucemia (LIF), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), RANTES, interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-12 (IL-12), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2), IP-10 y/o proteína inflamatoria de macrófagos 1α (MIP1α). Los agentes de unión a CD33 también pueden reducir la migración de macrófagos al sitio de las células tumorales.

En algunas realizaciones, la administración de una dosificación eficaz de un agente de unión a CD33 a un paciente reduce los niveles de al menos una citoquina, quimioquina o factor del crecimiento, pudiendo dicha citoquina, quimioquina o factor del crecimiento estimular el crecimiento y la proliferación de las células tumorales, estimular la migración de células efectoras no malignas, tales como macrófagos asociados a tumores (TAMS), hacia la vecindad del sitio del tumor y/o contribuir a la caquexia del cáncer. En realizaciones específicas, la citoquina, la quimioquina o el factor del crecimiento es, por ejemplo, interleuquin-1β (IL-1β), factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8), interferón-γ (IFN-γ), factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), factori inhibidor de leucemia (LIF), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), RANTES, interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-12 (IL-12), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2), IP-10 y/o proteína inflamatoria de macrófagos 1α (MIP1α).

En otra realización, se proporciona un método para retrasar el avance de un cáncer mediante la administración a un paciente de un régimen eficaz de un agente de unión a CD33 que puede unirse de modo específico a CD33. Como resultado de la administración del agente de unión a CD33 se retrasa el avance del cáncer, tal como reduciendo el crecimiento o la proliferación de las células tumorales, disminuyendo la metástasis, reduciendo el nivel de al menos una citoquina, quimioquina o factor del crecimiento, reduciendo la células efectoras no malignas en la vecindad de las células tumorales, o similares.

En otra realización, se proporciona un método para retrasar la carga tumoral en un paciente mediante la administración al paciente de un régimen eficaz de un agente de unión a CD33 que puede unirse de modo específico a CD33. Como resultado de la administración del agente de unión a CD33, la carga tumoral en el paciente se detiene o se reduce, tal como reduciendo el tamaño o la masa del tumor, reduciendo el nivel de al menos una citoquina, quimioquina o factor del crecimiento, reduciendo las células efectoras no malignas en la vecindad de las

células tumorales, inhibiendo la migración de macrófagos en la vecindad de las células tumorales, reduciendo el número de células efectoras no malignas (por ejemplo, TAMS o macrófagos) en el tumor, o similares.

En otra realización, se proporciona un método para reducir la carga tumoral o para retrasar el avance de un cáncer en un paciente mediante la administración al paciente de un régimen eficaz de un agente de unión a CD33 que puede unirse de modo específico a CD33. Como resultado de la administración del agente de unión a CD33, la carga tumoral en el paciente se detiene o se reduce, tal como reclutando células efectoras inmunológicas, como células NK o macrófagos o monocitos, que pueden destruir las células tumorales mediante mecanismos de mediación inmunológica.

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo mediado por células efectoras inmunológicas que puede contribuir a la actividad antitumoral de anticuerpos monoclonales (Weiner G.J., Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer, Immunol Res., 2007, 39(1-3):271-278). La importancia de la ADCC para una eficacia antitumoral ha sido demostrada en modelos preclínicos, por ejemplo, en modelos tumorales de ratón (por ejemplo, Clynes R.A., Towers T.L., Presta L.G., Ravetch J.V., Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytoxicity against tumor targets, Nat. Med., abril de 2000, 6(4):443-446). Los datos de ensayos clínicos apoyan la importancia de la ADCC para una eficacia clínica de anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, Weng W.K., Levy R., Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma, J. Clin. Oncol., 1 de noviembre de 2003, 21(21):3940-3947, Epub 15 de septiembre de 2003). Las interacciones de los anticuerpos monoclonales con los receptores de Fc sobre células inmunológicas contribuyen a la ADCC. El Fc de los anticuerpos puede modificarse para que muestre una afinidad potenciada por los receptores de Fc (por ejemplo, Presta L.G., Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function, Adv. Drug Deliv. Rev., 7 de agosto de 2006, 58(5-6):640-656, Epub 23 de mayo de 2006). Esta afinidad potenciada por los receptores de Fc produce una mayor actividad ADCC que puede conducir a una mayor eficacia antitumoral en pacientes.

En las diversas realizaciones descritas en esta sección, el agente de unión a CD33 puede utilizarse para tratar un cáncer positivo a CD33 (es decir, un cáncer que comprende células del cáncer que sobreexpresan el CD33 sobre su superficie celular, o que expresan el CD33 a niveles considerados aceptables para la terapia con anticuerpos CD33). El agente de unión a CD33 también puede utilizarse para tratar un cáncer que no sobreexpresa el CD33 sobre las células efectoras no malignas, con relación al tejido normal del mismo tipo. El cáncer puede ser, por ejemplo, una malignidad no hematológica o una malignidad hematológica. En ejemplos específicos, la malignidad hematológica puede ser positiva a CD33, y puede ser, por ejemplo leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica crónica, una leucemia eritrocítica, leucemia megacarioblástica aguda, linfoma histiocítico, un sarcoma mieloide, un trastorno proliferativo de células cebadas, o el síndrome mielodisplásico (MDS). En algunas realizaciones, la malignidad hematológica es una malignidad positiva a CD33, tal como leucemia mieloide aguda o síndrome mielodisplásico (MDS).

En las diversas realizaciones descritas en esta sección, el agente de unión a CD33 puede ser un anticuerpo anti-CD33 no conjugado. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo totalmente humano, humanizado o quimérico, tal como un anticuerpo M 195 quimérico o humanizado. El anticuerpo también puede ser otro anticuerpo, tal como un anticuerpo que compite con el anticuerpo M 195 por la unión específica a CD33. El anticuerpo también puede unirse al mismo epitopo que el anticuerpo M 195 o a un epitopo diferente.

En otras realizaciones, el agente de unión a CD33 puede unirse (es decir, conjugarse) con una citotoxina. La citotoxina puede ser, por ejemplo, una toxina peptídica, tal como saporina, ricina, clorotoxina, exotoxina de *Pseudomonas*, endotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria. La citotoxina también puede ser una toxina química (es decir, con una base no peptídica), tal como calicheamicina, doxorrubicina, una camptotecina, daunorrubicina, u otros agentes de unión al ADN. La citotoxina también puede ser una auristatina, un maitansinoide, una dolastatina, u otros agentes bloqueantes de microtúbulos.

Un agente de unión a CD33 que es un anticuerpo anti-CD33 puede administrarse al paciente por vía intravenosa o subcutánea, a una dosis de 0,1 mg/kg o menor, a aproximadamente 25 mg/kg, preferiblemente de 1,0 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Un agente de unión a CD33 que es un fragmento de un anticuerpo anti-CD33 u otra proteína de unión a CD33 puede administrarse en una dosificación equivalente a una dosis de 0,1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de 1,0 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del anticuerpo intacto. El agente de unión a CD33 puede administrarse por vía intravenosa o subcutánea al paciente según un programa que sea, por ejemplo, diario, semanal, bisemanal, trisemanal (es decir, cada tres semanas) o mensual, o una combinación de éstos, al paciente. El agente de unión a CD33 puede administrarse durante un periodo de al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, o más, según sea necesario. En algunas realizaciones, a la fase de tratamiento (supra) con el agente de unión a CD33 le sigue una fase de mantenimiento, en la que se administran dosis del agente de unión a CD33 con menos frecuencia que durante la fase de tratamiento. Por ejemplo, pueden administrarse dosis de mantenimiento semanales, bisemanales, trisemanales o mensuales, durante un periodo de 1-6 meses. Las dosificaciones en la fase de mantenimiento pueden ser iguales que las dosificaciones en la fase de tratamiento.

Tratamiento de una malignidad hematológica en remisión

En otro aspecto, se proporcionan métodos para prevenir o retrasar la recurrencia de una malignidad hematológica (por ejemplo, leucemia) en un paciente, mediante la administración al paciente en remisión de la malignidad hematologica de una dosificación eficaz de un agente de unión a CD33, lo cual resulta en prevenir o retrasar la recurrencia de la malignidad hematológica subyacente. El agente de unión a CD33 se une de modo específico al CD33 sobre la superficie de la malignidad hematológica (es decir, la célula leucémica) y/o a células efectoras no malignas.

En esta descripción, un "paciente" generalmente es un ser humano que está sometiéndose a un tratamiento o que se le ha diagnosticado una malignidad hematológica. En algunas realizaciones, la malignidad hematológica es una malignidad hematológica positiva a CD33. Las malignidades hematológicas incluyen, pero no se limitan a leucemias (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica, y leucemia de células pilosas. Los trastornos sanguíneos relacionados incluyen, pero no se limitan a síndrome mielodisplásico (MDS), mielofibrosis, enfermedad mieloproliferativa (por ejemplo, policitemia vera (PV, PCV o PRV), trombocitosis esencial (ET), y amiloides debidos a una enfermedad de la cadena ligera.

La expresión "malignidad hematológica positiva a CD33" se refiere a una malignidad hematológica caracterizada por la expresión del CD33 sobre la superficie de las células malignas. Las malignidades hematológicas positivas a CD33 incluyen, pero no se limitan a leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica, leucemia de trombocitos, un síndrome mielodisplásico, un trastorno mieloproliferativo, anemia refractaria, un síndrome de preleucemia, una leucemia linfoide, o una leucemia indiferenciada.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la administración a un paciente en remisión de una malignidad hematológica positiva a CD33 de un régimen eficaz de un agente de unión a CD33, por lo cual la recurrencia de la malignidad hematológica se previene o se retrasa. En algunas realizaciones, el paciente carece de células detectables de la malignidad hematológica. Tal como se emplea en la presente, una "falta de células detectables" se determina mediante métodos de diagnóstico o prognóstico convencionales. Un paciente en remisión de la AML muestra generalmente una resolución de las características clínicas anómalas, la vuelta a los recuentos sanguíneos normales, y una hematopoyesis normal en la médula ósea con <5% de células blásticas, un recuento de neutrófilos de >1.000-1.500, un recuento de plaquetas de >100.000, y la desaparición del clon leucémico. Véase, por ejemplo, The Merck Manual, sec. 11, cap. 138 (17ª ed., 1997); Estey, 2001, Cancer, 92(5):1059-1073.

El agente de unión a CD33 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que se une de modo específico a CD33 y la malignidad hematológica puede ser leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica, leucemia timoide, un síndrome mielodisplásico, un trastorno mieloproliferativo, anemia refractaria, una síndrome de preleucemia, una leucemia linfoide, o una leucemia indiferenciada.

En algunas realizaciones, el paciente en remisión de la malignidad hematológica no ha sido sometido a un transplante de médula ósea. En otras realizaciones, el paciente en remisión de la malignidad hematológica sí ha sido sometido a un transplante de médula ósea. El transplante de médula ósea puede ser autólogo o puede ser un transplante de médula ósea alogénico.

Los siguientes tipos de cáncer son especialmente adecuados para ser tratados con los anticuerpos según la presente invención: cánceres portados en la sangre que incluyen, pero no se limitan a leucemia linfoblástica aguda "ALL", leucemia de células B linfoblástica aguda, leucemia de células T linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda "AML", leucemia promielocitica aguda "APL", leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroleucémica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia indiferenciada aguda, leucemia mielocítica crónica "CML", leucemia linfocítica crónica "CLL", leucemia de células pilosas, y mieloma múltiple.

Las leucemias agudas y crónicas que son adecuadas para ser tratadas mediante los agente de unión a CD33 incluyen: leucemias linfoblásticas, mielógenas, linfocíticas, mielocíticas y leucemia trombocítica. Además el síndrome de mielodisplasia, el trastorno mieloproliferativ, la anemia refractaria, el síndrome de preleucemia, la leucemia linfoide o la leucemia indiferenciada pueden tratarse con los agentes de unión a CD33.

Combinaciones con otras sustancias activas

Dependiendo del trastorno a tratar, se pueden usar los agentes de unión a CD33 de la invención por sí mismos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en particular seleccionados de agentes que dañan al ADN, que desmetilan el ADN o de unión a tubulina, o compuestos terapéuticamente activos que inhiben la angiogénesis, las vías de transducción de señales o los puntos de control mitóticos en células cancerosas o que tienen función inmunomoduladora (IMID).

El agente terapéutico adicional se puede administrar de modo simultáneo, opcionalmente como un componente de la misma preparación farmacéutica, o antes o después de la administración del agente de unión a CD33.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede ser, sin límiteción, uno o más inhibidores seleccionados del grupo de inhibidores de la familia EGFR, la familia VEGFR, VEGF, IGF-1R, receptores de insulina, auroraA, auroraB, PLK y PI3 quinasa, FGFR, PDGFR, Raf, KSP o PDK1.

Otros ejemplos de agentes terapéuticos adicionales son los inhibidores de CDK, Akt, Src, Bcr-Abl, cKit, cMet/HGF, Her2, Her3, c-Myc, Flt3, HSP90, antagonistas de erizo, inhibidores de JAK/STAT, Mek, mTor, NFkappaB, el proteasoma, Rho, un inhibidor de la señalización de Wnt o de la señalización de Notch, o un inhibidor de la vía de la ubiquitinación.

Otros ejemplos de agentes terapéuticos adicionales son los inhibidores de la ADN polimerasa, topoisomerasa II, inhibidores de múltiples tirosina quinasas, antagonistas de CXCR4, inhibidores de IL3RA, antagonistas de RAR, inhibidores de KIR, vacunas inmunoterapéuticas, inhibidores de TUB, inductores de Hsp70, inhibidores de la familia de IAP, inhibidores del ADN metiltransferasa, inhibidores de TNF, inhibidores de la tirosina quinasa receptores ErbB1, inhibidores de múltiples quinasas, inhibidores de JAK2, inhibidores de RR, inductores de la apoptosis, inhibidores de HGPRTasa, antagonistas del receptor de histamina H2 y agonistas del receptor CD25.

Los ejemplos de inhibidores de aurora son, sin limitación, PHA-739358, AZD-1152, AT-9283, CYC-116, R-763, VX-667, MLN-8045, PF-3814735, SNS-314, VX-689, GSK-1070916, TTP-607, PHA-680626, MLN-8237, BI847325 y ENMD-2076.

Los ejemplos de inhibidores de PLK son GSK-461364, BI2536 y BI6727.

Los ejemplos de inhibidores de raf son BAY-73-4506 (también un inhibidor de VEGFR), PLX-4032, RAF-265 (también un inhibidor de VEGFR), sorafenib (también un inhibidor de VEGFR), XL-281, nevavar (también un inhibidor de VEGFR) y PLX4032.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los ejemplos de inhibidores de cKit son masitinib, OSI-930 (también actúa como un inhibidor de VEGFR), AC-220

(también un inhibidor de Flt3 y PDGFR), tandutinib (también un inhibidor de Flt3 y PDGFR), axitinib (también un inhibidor de VEGFR y PDGFR), sunitinib (también un inhibidor de Flt3, PDGFR, VEGFR) y XL-820 (también actúa como un inhibidor de VEGFR- y PDGFR), imatinib (también un inhibidor de bcr-abl), nilotinib (también un inhibidor de bcr-abl y PDGFR).

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

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

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

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

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

Los ejemplos de agentes desmetilantes son 5-azacitidina y decitabina.

Los ejemplos de agentes antiangiogénicos son los inhibidores de FGFR, PDGFR y VEGF(R), y las talidomidas, tales como agentes seleccionados, sin limitación, de bevacizumab, motesanib, CDP-791, SU-14813, telatinib, KRN-951, ZK-CDK (también un inhibidor de CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiD, talidomida, CC-4047, lenalidomida, ENMD-0995, IMC-D11, Ki-23057, brivanib, cediranib, 1B3, CP-868596, IMC-3G3, R-1530 (también un inhibidor de Flt3), sunitinib (también un inhibidor de cKit y Flt3), axitinib (también un inhibidor de cKit), lestaurtinib (también un inhibidor de Flt3 y PKC), vatalanib, tandutinib (también un inhibidor de Flt3 y cKit), pazopanib, PF-337210, aflibercept, E-7080, CHIR-258, tosilato de sorafenib (también un inhibidor de Raf), vandetanib, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (también un inhibidor de EGFR y Her2), BAY-57-9352 (también un inhibidor de Raf), BAY-73-4506 (también un inhibidor de Raf), XL-880 (también un inhibidor de cMet), XL-647 (también un inhibidor de EGFR y EphB4), XL-820 (también un inhibidor de cKit), nilotinib (también un inhibidor de cKit y brc-abl), CYT-116, PTC-299, BMS-584622, CEP-11981, dovitinib, CY-2401401, ENMD-2976 y BIBF1120.

El agente terapéutico adicional se puede seleccionar también de inhibidores de EGFR, y puede ser un inhibidor de EGFR de molécula pequeña o un anticuerpo anti-EGFR. Los ejemplos de anticuerpos anti-EGFR, sin limitación, son cetuximab, panitumumab, nimotuzumab, zalutumumab; los ejemplos de inhibidores de EGFR de molécula pequeña son gefitinib, erlotinib ,vandetanib (también un inhibidor de VEGFR) y afatinib (también un inhibidor de Her2). Otro ejemplo de un agente modulador de EGFR es la toxina de fusión EGF.

Otros inhibidores de EGFR y/o Her2 útiles para su combinación con un agente de unión a CD33 de la invención son lapatinib, trastuzumab, pertuzumab, XL-647, neratinib, BMS-599626 ARRY-334543, AV-412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (también un inhibidor de VEGFR), AZD-8931, ARRY-380 ARRY-333786, IMC-11F8, zemab, TAK-285, AZD-4769, y afatinib (inhibidor dual de Her2 y EGFR).

Los inhibidores de la ADN polimerasa útiles para su combinación con un agente de unión a CD33 de la invención son Ara-C/citarabina, clolar/clofarabina.

Un inhibidor de la ADN metiltransferasa útil para su combinación con un agente de unión a CD33 de la invención es vidaza/azacitidina.

Un inductor de la apoptosis útil para su combinación con un agente de unión a CD33 de la invención es trisenox/trióxido de arsénico.

Los inhibidores de la topoisomerasa II útiles para su combinación con un agente de unión a CD33 de la invención son idarrubicina, daunorrubicina y mitoxantrona.

Un antagonista de RAR útil para su combinación con un agente de unión a CD33 de la invención es vesanoide/tretinoína.

Un inhibidor de la HGPRTasa útil para su combinación con un agente de unión a CD33 de la invención es mercapto/mercaptopurina.

Un antagonista del receptor de histamina H2 útil para su combinación con un agente de unión a CD33 de la invención es cepleno/diclorhidrato de histamina.

Un agonista del receptor CD25 útil para su combinación con un agente de unión a CD33 de la invención es IL-2.

El fármaco adicional también puede seleccionarse de agentes que se dirigen a las vías de IGF-1R y del receptor de insulina. Tales agentes incluyen anticuerpos que se unen a IGF-1R (por ejemplo CP-751871, AMG-479, IMC-A12, MK-0646, AVE-1642, R-1507, BIIB-022, SCH-717454, rhu Mab IGFR y nuevas entidades químicas que tienen como

diana el dominio quinasa del IGF1-R (por ejemplo OSI-906 o BMS-554417, XL-228, BMS-754807).

Otros agentes pueden pueden combinarse de modo ventajoso en una terapia con el agente de unión a CD33 de la invención son moléculas que se dirigen a CD20, incluyendo anticuerpos específicos de CD20, tales como rituximab, LY-2469298, ocrelizumab, MEDI-552, IMMU-106, GA-101 (= R7159), XmAb-0367, ofatumumab, anticuerpos CD20 radiomarcados, tales como tositumumab y ibritumomab tiuxetano u otras proteínas dirigidas a CD20, tales como SMIP Tru015, PRO-131921, FBT-A05, veltuzumab, y R-7159.

Los agentes de unión a CD33 pueden combinarse con inhibidores de otros antígenos de superficie expresados sobre leucocitos, en particular anticuerpos o moléculas de tipo anticuerpo, por ejemplo anti-CD2 (siplizumab), anti-CD4 (zanolimumab), anti-CD19 (MT-103, MDX-1342, SAR-3419, XmAb-5574), anti-CD22 (epratuzumab), anti-CD23 (lumiliximab), anti-CD30 (iratumumab), anti-CD32B (MGA-321), anti-CD38 (HuMax-CD38), anti-CD40 (SGN40), anti-CD52 (alemtuzumab), y anti-CD80 (galiximab).

Otros agentes que pueden combinarse con los agentes de unión a CD33 son inmunotoxinas, tales como BL-22 (una inmunotoxina anti-CD22), inotuzumab ozogamicina (un conjugado de anticuerpo anti-CD23-calicheamicina), RFT5.dgA (una cadena de la toxina A de ricina anti-CD25), SGN-35 (un conjugado de anti-CD30-auristatina E), y gemtuzumab ozogamicina (un conjugado de anti-CD33-calicheamicina), MDX-1411 (conjugado anti-CD70), o anticuerpos radiomarcados, tales como ^{90}Y-epratuzumab (radioinmunoconjugado anti-CD22).

Además, los agentes de unión a CD33 pueden combinarse con inmunomoduladores, agentes, por ejemplo anticuerpos, que induzcan la apoptosis o modifiquen las vías de transducción de señales, tales como los moduladores del receptor TRAIL mapatumumab (un agonista del receptor TRAIL-1), lexatumumab (un agonista del receptor TRAIL-2), tigatuzumab, apomab, AMG-951 y AMG-655; un anticuerpo anti-HLA-DR (tal como 1D09C3), un anti-CD74, un inhibidor del ligando del factor de diferenciación de osteoclastos (tal como denosumab), un antagonista de BAFF (tal como AMG-623a) o un agonista de un receptor de tipo Toll (por ejemplo, TLR-4 o TLR-9).

Otros fármacos que pueden utilizarse en combinación con los agentes de unión a CD33 de la presente invención se seleccionan, pero no se limitan a hormonas, análogos hormonales y compuestos antihormonales (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, fulvestrant, acetato de megestrol, flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona, finasterida, acetato de buserelina, fludrocortinsona, fluoximesterona, medroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesterona, dietilestilbestrol, propionato de testosterona, fluoximesterona/equivalentes, octreotida, arzoxifeno, pasireotida, vapreotida, adrenocorticoesteroides/antagonists, prednisona, dexametasona, ainoglutetimida), inhibidores de aromatasas (por ejemplo, anastrozol, letrozol, liarozol, exemestano, atamestano, formestano), agonistas y antagonistas de LHRH (por ejemplo, acetato de goserelina, leuprolida, abarelix, cetrorelix, deslorelina, histrelina, triptorelina), antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos, tales como metotrexato, trimetrexato, pemetrexed, análogos de pirimidina, tales como 5-fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, capecitabina, decitabina, nelarabina, 5-azacitidina, y gemcitabina, análogos de purina y de adenosina, tales como mercaptopurina, tioguanina, azatioprina, cladribina y pentostatina, citarabina, fludarabina, clofarabina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas, tales como doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina y idarrubicina, mitomicina-C, bleomicina, dactinomicina, plicamicina, esplicamicina, actimomicina D, mitoxantrona, mitoxantronidarrubicina, pixantrona, estreptozocina, afidicolina); derivados del platino (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, lobaplatino, satraplatino); agentes alquilantes (por ejemplo, estramustina, semustina, mecloretamina, melfalano, clorambucilo, busulfano, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida, hidroxiurea, temozolomida, nitrosoureas, tales como carmustina y lomustina, tiotepa); agentes antimitóticos (por ejemplo, vinca-alcaloides, tal como vinblastina, vindesina, vinorelbina, vinflunina y vincristina; y taxanos, tales como paclitaxel, docetaxel y sus formulaciones, larotaxel; simotaxel, y epotilonas, tales como ixabepilona, patupilona, ZK-EPO); inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas, tales como etopósido y etopofós, tenipósido, amsacrina, topotecano, irinotecano, banoxantrona, camptotecina) y diversos productos quimioterapéuticos, tales como derivados del ácido retinoico, amifostina, anagrelida, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, interleuquina-2, procarbazina, N-metilhidrazina, mitotano, y porfímero, bexaroteno, celecoxib, etilenmina/metilmelamina, trietilenmelamina, trietilentiofosforamida, hexametilmelamina, y las enzimas L-asparaginasa, L-arginasa y metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, RSU 1069, EO9, RB 6145, SR4233, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina, 5-yododesoxiuridina, bromodesoxicitidina, eritrohidroxinoniladenina, antracendiona, GRN-163L (un antagonista de molde de telomerasa competitivo), SDX-101 (un agonista de PPAR), talabostato (un inhibidor de DPP), forodesina (un inhibidor de PNP), atacicepto (un receptor soluble que se dirige a los miembros de la familia del TNF BLyS y APRIL), agentes neutralizantes de TNF-alfa (Enbrel, Humira, Remicade), XL-844 (un inhibidor de CHK1/2), VNP-40101M (un agente ADN-alquilante), SPC-2996 (un inhibidor de bcl2 antisentido), obatoclax (un inhibidor de bcl2), enzastaurina (un beta-modulador de PKC), vorinistato (un inhibidor de HDAC), romidepsina (un inhibidor de HDAC), AT-101 (un inhibidor de Bcl-2/Bcl-xL), plitidepsina (un depsipéptido de múltiples acciones), SL-11047 (un modulador del metabolismo de poliaminas).

Los agentes de unión a CD33 de la invención también pueden utilizarse en combinación con otras terapias, que incluyen cirugía, transplante de células precursoras, radioterapia, terapia endocrina, modificadores de la respuesta biológica, hipertemia y crioterapia, y agentes para atenuar cualquier efecto adverso (por ejemplo, antieméticos), G-CSF, GM-CSF, fotosensibilizantes, tales como derivados de hematoporfirina, fotofrina, derivados de benzoporfirina, Npe6, etioporpirina de estaño, feoborida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianinas de cinc.

Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Los agentes de unión a CD33 puede estar en cualquier forma que permita administrar la composición a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido o de un líquido. El modo preferido de aplicación es parenteral, por infusión o inyección (intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica), pero también pueden ser aplicables otros modos de aplicación, tales como por inhalación, transdérmico, intranasal, bucal, oral e intratumoral. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraestemal, o técnicas de infusión. En un aspecto, las composiciones se administran por vía parenteral. En otro aspecto, los compuestos se administran por vía intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para permitir que un compuesto esté biodisponible tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, en las que, por ejemplo, un recipiente de un compuesto en forma de aerosol puede albergar una pluralidad de unidades de dosificación.

Los materiales utilizados para preparar las composiciones farmacéuticas pueden ser no tóxicos en las cantidades empleadas. Será evidente para los expertos en la técnica que la dosificación óptima del ingrediente o ingredientes activos en la composición farmacéutica dependerá de una diversidad de factores. Los factores pertinentes incluyen, sin limitación, el tipo de paciente (por ejemplo, un ser humano), la forma concreta del compuesto, el modo de administración, y la composición empleada.

El vehículo o portador farmacéuticamente aceptable puede estar en partículas, de forma que las composición están, por ejemplo, en forma de polvo. El vehículo o vehículos pueden ser líquidos, y las composiciones pueden ser, por ejemplo, un líquido inyectable. La composición puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, para la inyección parenteral. En una composición para la administración mediante inyección, también puede incluirse uno o más tensioactivos, conservantes, agentes humectantes, agentes dispersantes, agentes suspensores, tampones, estabilizantes y agentes isotónicos.

Las composiciones líquidas, tanto si son disoluciones, suspensiones u otra forma parecida, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles, tales como agua para inyección, disolución salina, preferiblemente disolución salina fisiológica, disolución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles, tales como mono- o diglicéridos sintéticos que pueden actuar como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; estabilizantes, tales como aminoácidos; tensioactivos, tales como polisorbatos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una composición parenteral puede estar dentro de una ampolla, una jeringa desechable o un vial de múltiples dosis fabricado de vidrio, plástico u otro material. Un ejemplo de adyuvante es la disolución salina fisiológica. Una composición inyectable es preferiblemente estéril.

Los agentes de unión a CD33 también pueden secarse (liofilizarse, secarse por pulverización, secarse por pulverización-congelación, secarse con gases supercríticos o casi supercríticos, secarse al vacío, secarse al aire), precipitarse o cristalizarse, o atraparse en microcápsulas que se preparan, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial utilizando, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o gelatina y poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de transporte de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, nanopartículas y nanocápsulas), en macroemulsiones, o precipitarse o inmovilizarse sobre vehículos o superficies, por ejemplo mediante la tecnnología de pcmc ("protein coated microcrystals", microcristales revestidos con proteína). Estas técnicas se describen en Remington, . The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, Hendrickson R. ed.

La cantidad de la composición que es eficaz para el tratamiento de un trastorno o una afección concretos dependerá de la naturaleza del trastorno o de la afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos in vitro o in vivo para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en las composiciones dependerá también de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad o del trastorno, y deberá decidirse según el criterio del médico y de las circunstancias de cada paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un fármaco o fármacos, o agente o agentes, de tal forma que se obtenga una dosificación adecuada. Generalmente, esta cantidad es al menos aproximadamente 0,01% de un fármaco o agente en peso de la composición. Cuando se prevé una administración oral, esta cantidad puede variar en un intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 80% en peso de la composición. En un aspecto, las composiciones orales pueden comprender de aproximadamente 4% a aproximadamente 50% del compuesto en peso de la composición. En otro aspecto, las presentes composiciones se prepararn de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 2% en peso del compuesto.

Para la administración intravenosa, la composición puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente

50 mg de un fármaco o agente por kg de peso corporal del paciente. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1, 1,5 ó 2,5 a aproximadamente 50 mg de un fármaco o agente por kg de peso corporal del paciente. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el intervalo de aproximadamente 1, 1,5 ó 2,5 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal de un fármaco o agente.

En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un paciente es menor que 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg del peso corporal del paciente (para la conversión a mg/mm^2, puede utilizarse un BSA de 1,8 m^2 y un peso corporal de 80 kg).

Tal como se analiza en la presente, el agente de unión a CD33 puede administrarse por vía intravenosa o subcutánea al paciente según un programa que sea, por ejemplo, diario, semanal, bisemanal, trisemanal o mensual al paciente. Por ejemplo, un agente de unión a CD33 puede administrarse de modo semanal, durante un periodo de 2 a 10 semanas, generalmente 3-6 semanas. En algunas realizaciones, el régimen de dosificación del agente de unión a CD33 mantiene una concentración en suero sanguíneo de anticuerpo de al menos 5 µg/ml o al menos 10 µg/ml durante el ciclo de dosificación. El agente de unión a CD33 puede administrarse, por ejemplo, en 1-8 o más ciclos. En algunas realizaciones, un agente de unión a CD33 se administra de modo crónico a un sujeto.

Como ejemplo, la invención incluye un método para tratar un cáncer, tal como leucemia mieloide, mediante la administración de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 1,5-8 ó 2,5-8 mg/kg, de un anticuerpo anti-CD33 según la invención de modo semanal. Este tratamiento habitualmente puede continuar durante aproximadamente 1-3 meses, generalmente durante aproximadamente dos meses. En una realización, el programa de dosificación se mantiene hasta que se advierte una reducción en los blastos. Por ejemplo, la dosificación puede continuar hasta aproximadamente 6 meses. A este tratamiento le puede seguir un programa de dosificación menos frecuente, que implica, por ejemplo, dosis bisemanales (o dos veces al mes). Este programa de dosificación puede mantenerse durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 meses o más para mantener una reducción en los blastos y/o una remisión.

En algunas realizaciones, un agente profiláctico puede administrarse con un agente de unión a CD33 para minimizar las reacciones de infusión. Los agentes profilácticos adecuados incluyen, por ejemplo, metilprednisolona, difenildramina, acetaminofeno u otro agente adecuado. El agente profiláctico puede administrarse antes o aproximadamente al mismo tiempo que el agente de unión a CD33.

El fármaco o fármacos, o el agente o los agentes, o las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral , mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de transporte, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y pueden utilizarse para administrar un compuesto. En ciertas realizaciones, se administra más de un fármaco o agente o composición a un paciente.

Puede resultar deseable administrar uno o más fármacos o agentes o composiciones de modo local al área que necesita tratamiento, según se apropiado para el fármaco o el agente. Esto puede lograrse, por ejemplo, y no como limitación, mediante la infusión local durante una cirugía; la aplicación tópica, por ejemplo junto con una venda para heridas después de una cirugía; mediante inyección: mediante un catéter; mediante un supositorio; o mediante un implante, estando fabricado el implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede realizarse mediante una inyección directa en el sitio (o el sitio anterior) de un cáncer, un tumor, o un tejido neoplásico o preneoplásico.

El fármaco o fármacos, o el agente o agentes, o las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada, tal como una bomba o diversos materiales poliméricos. En otra realización, un sistema de liberación controlada puede colocarse cerca de la diana del fármaco o fármacos, o del agente o agentes, o de las composiciones, con lo cual se requiere sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Pueden utilizarse otros sistemas de liberación controlada que se analizan en el informe de Langer (1990, Science, 249:1527-1533).

Los fármacos o los agentes se formulan según procedimientos habituales en forma de una composición farmacéutica adaptada a la administración intravenosa a animales, en particular seres humanos, según sea apropiado para el fármaco o el agente. De forma típica, los vehículos o portadores para la administración intravenosa son disoluciones tampón acuosas isotónicas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para la administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local, tal como lignocaína, para mitigar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados entre sí en la forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando el fármaco o el agente se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con una botella de infusión que contenga disolución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando el fármaco o el agente se va a administrar mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o disolución salina, de forma que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Las composiciones de agentes terapéuticos también pueden administrarse según formas de dosificación aceptadas, en forma de comprimidos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes, o elixires, por ejemplo. Las composiciones para la administración oral pueden contener uno o más agente opcionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes aromatizantes, tales como menta, aceite de gualteria, o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente agradable al paladar. Además, cuando están en forma de comprimidos o píldoras, las composiciones puede revestirse para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando con ello una acción sostenida a lo largo de un periodo extendido de tiempo. Las membranas selectivamente permeables que rodean a un compuesto conductor osmóticamente activo también son adecuadas para fármacos o agentes para la administración oral. En estas plataformas, el fluido del entorno que rodea a la cápsula es embebido por el compuesto conductor, que se hincha para desplazar al agente o a la composición de agente a través de un orificio. Estas plataformas de transporte pueden proporcionar un perfil de transporte de orden fundamentalmente cero, en oposición a los perfiles con picos de las formulaciones de liberación inmediata. También puede utilizarse un material de retraso en el tiempo, tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol.

La composición puede incluir diversos materiales que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que formen una envuelta de revestimiento alrededor de los ingredientes activos. Los materiales que forman la envuelta de revestimiento generalmente son inertes, y pueden seleccionarse, por ejemplo, de azúcar, goma laca, y otros agentes de revestimiento entérico. Como alternativa, los ingredientes activos pueden encapsularse en una cápsula de gelatina.

Las composiciones pueden administrarse a un paciente que las necesite con una frecuencia, o a lo largo de un periodo de tiempo, que es determinado por el médico encargado. Las composiciones pueden administrarse a lo largo de un periodo de 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 14 días, 21 días, 28 días, un mes, dos meses, o periodos de tiempo más largos. Se entiende que las composiciones pueden administrarse durante cualquier periodo de tiempo entre 1 día y dos meses o más.

Producción de anticuerpos

Pueden producirse anticuerpos utilizando cualquier método útil para la síntesis de anticuerpos, en particular, tal como mediante expresión recombinante o síntesis química.

La expresión recombinante de anticuerpos, o sus fragmentos o derivados, generalmente implica la construcción de un ácido nucleico que codifique el anticuerpo. Si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, un ácido nucleico que codifique el anticuerpo o un polipéptido de éste puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados de modo químico (por ejemplo, según se describe en Kutmeier at al., 1994, BioTechniques, 17:242), lo cual implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contengan porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y el acoplamiento de estos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos acoplados, por ejemplo mediante PCR.

Como alternativa, una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un polipéptido de éste puede generarse a partir de una fuente adecuada. Si no está disponible un clon que contenga el ácido nucleico que codifica el anticuerpo concreto, pero la secuencia del anticuerpo es conocida, puede obtenerse un ácido nucleico que codifique el anticuerpo a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, un banco de ADNc de anticuerpos, o un banco de ADNc generado a partir de cualquier tejido o célula que exprese la inmunoglobulina), por ejemplo mediante amplificación con PCR empleando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia, o mediante clonación utilizando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica concreta.

Si un anticuerpo que reconoce de modo específico un antígeno concreto no está disponible en el mercado (o si no está disponible una fuente para un banco de ADNc para clonar un ácido nucleico que codifique dicha inmunoglobulina) pueden generarse anticuerpos específicos para un antígeno concreto mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la inmunización de un paciente, o un modelo animal adecuado, tal como un conejo o un ratón, para generar anticuerpos policlonales o, más preferiblemente, mediante la generación de anticuerpos monoclonales, por ejemplo como se describe en Kohler y Milstein (1975, Nature, 256:495-497) o como se describe en Kozbor et al. (1983, Immunology Today, 4:72), o en Cole et al. (1985, en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Como alternativa, puede obtenerse un clon que codifique al menos la porción Fab del anticuerpo mediante la selección de bancos de expresión de Fab (por ejemplo, como se describe en Huse et al., 1989, Science, 246, 1275-1281) para clones de fragmentos Fab que se unen al antígeno específico, o mediante la selección de bancos de anticuerpos (véase, por ejemplo, Clackson et al., 1991, Nature, 352:624; Hane et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937).

Cuando se ha obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifique al menos el dominio variable del anticuerpo, puede introducirse en un vector que contenga la secuencia de nucleótidos que codifica las regiones constantes del anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 86/05807; el documento WO 89/01036; y la patente de EEUU nº 5.122.464). Están disponibles vectores que contienen la cadena ligera o pesada completa que permiten la expresión de una molécula de anticuerpo completa. Después, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede utilizarse para introducir la sustitución o sustituciones, o la deleción o deleciones, necesarias para sustituir (o

delecionar) el resto o los restos cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracaternario, por un resto aminoácido que no contenga un grupo sulfhidrilo. Estas modificaciones pueden realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la introducción de mutaciones o deleciones específicas en una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, pero sin limitarse a la mutagénesis química y la mutagénesis dirigida al sitio in vitro (véase, por ejemplo, Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem., 253:6551).

Además, se han desarrollado técnicas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (véase, por ejemplo, Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature, 314:452-454). Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de una inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Cuando se ha obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo puede producirse mediante la tecnología del ADN recombinante utilizando técnicas conocidas en la técnica. Pueden utilizarse los métodos conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan las secuencias codificadoras del anticuerpo y las señales de control de la transcripción y de la traducción adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas, y recombinación genética in vivo. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Publish., Cold Spring Harbor, N.Y.), y Ausubel et al. (eds., 1993-2006, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo, o la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo, puede transferirse a una célula hospedante mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transacción liposómica, precipitación con fosfato de calcio o transducción), y las células resultantes entonces se cultivan mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo. En realizaciones específicas, la expresión del anticuerpo se regula mediante un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido.

Las células hospedantes utilizadas para expresar el anticuerpo recombinante pueden ser células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, o preferiblemente células eucariotas, en especial para la expresión de moléculas de inmunoglobulina recombinantes. En particular, las células de mamífero, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector que contenga el elemento promotor génico temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, son un sistema de expresión eficaz para las inmunoglobulinas (véase, por ejemplo, Foecking et al., 1986, Gene, 45:101; Cockett el al., 1990, BioTechnology, 8:2). La línea de células CHO puede ser, por ejemplo, DG44 o CHO-S. En otro ejemplo, un anticuerpo puede expresarse utilizando el sistema CHEF (véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.888.809).

Puede utilizarse una diversidad de otros sistemas de vectores de expresión-hospedante para expresar anticuerpos. Estos sistemas de expresión-hospedante representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificadoras del anticuerpo pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias de nucleótidos codificadoras apropiadas, expresan una molécula de anticuerpo de inmunoglobulina in situ. Estas incluyen, pero no se limitan a microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, de ADN plasmídico o de ADN cosmídico que contienen secuencias codificadoras de inmunoglobulinas; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contiene secuencias codificadoras del anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificadoras de inmunoglobulinas; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV)), o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contiene secuencias codificadoras de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, CHO-S, BH, 293, 293T o 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus de vaccinia 7.5K).

En sistemas bacterianos, una serie de vectores de expresión puede seleccionarse de modo ventajoso dependiendo del uso previsto para el anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando una gran cantidad de dicha proteína se quiere producir, pueden resultar deseables vectores que dirijan la expresión de niveles altos de productos de proteínas de fusión que puedan purificarse con facilidad. Estos vectores incluyen, pero no se limitan al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J., 2:1791-94), en el que la secuencia codificadora del anticuerpo puede acoplarse de modo individual al vector dentro de marco con la región codificadora de lac Z, de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye y Inouye, 1985, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem., 24:5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también pueden utilizarse para expresar polipéptidos extraños en forma de proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse con facilidad a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de esferas de glutatión-agarosa, seguido de una elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para que incluyan sitios de ruptura de proteasas de

factor Xa o trombina, de modo que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, puede utilizarse el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) o el virus análogo de *Drosophila melanogaster* como vector para expresar genes extraños. El virus se desarrolla en células de *Spodopiera frugipenta*. La secuencia que codifica el anticuerpo puede clonarse de modo individual en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

En células hospedantes de mamífero puede utilizarse una serie de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificadora del anticuerpo de interés puede acoplarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico entonces puede insertarse en el genoma del adenovirus mediante recombinación in vitro o in vivo. La inserción de una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, región E1 o E3) produce un virus recombinante que es viable y es capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en hospedantes infectados (véase, por ejemplo, Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :355-359). También pueden ser necesarias señales de inicio específicas para la traducción eficaz de las secuencias codificadoras del anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y las secuencia adyacentes. Además, el codón de inicio se relaciona operablemente con el marco de lectura de la secuencia codificadora deseada para asegurar la traducción del inserto entero. Estas señales de control de la traducción y codones de inicio exógenos pueden tener una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción apropiados, etc. (véase, por ejemplo, Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol., 153:51-544).

Además puede elegirse una cepa de célula hospedante para que module la expresión de las secuencias insertadas, o para que modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. Estas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, ruptura y escisión) de los productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células hospedantes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccional de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse las líneas celulares o sistemas de hospedantes apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este objetivo, pueden utilizarse células hospedantes eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto génico. Estas células hospedantes de mamífero incluyen, pero no se limitan a CHO (por ejemplo, DG44 o CHO-S), VERY, BH, HeIa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse líneas celulares que expresen de forma estable un anticuerpo. En lugar de utilizar vectores de expresión que contengan orígenes de la replicación víricos, las células hospedantes pueden transformarse con ADN controlado por los elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, las células modificadas se cultivan durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar el plásmido de modo estable en sus cromosomas y crecer para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede emplearse de modo ventajoso para modificar líneas celulares que expresan el anticuerpo. Estas líneas celulares modificadas pueden ser particularmente útiles para la selección y la evaluación de antígenos tumorales que interaccionan directa o indirectamente con el anticuerpo.

Puede utilizarse una serie de sistemas de selección. Por ejemplo, pueden emplearse los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simplex (véase, por ejemplo, Wigler et al., 1977, Cell, 11:223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (véase, por ejemplo, Szybalska y Szybalski, 1992, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 48:202), y adenina fosforribosiltransferasa (véase, por ejemplo, Lowy et al. , 1980, Cell, 22:817) en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además puede utilizarse la resistencia a antimetabolitos como base para la selección de los siguientes genes: DHFR, que confiere resistencia al metotrexato (véase, por ejemplo, Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 77:3567-3570; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527-1531); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (véase, por ejemplo, Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072-2076); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (véase, por ejemplo, Clinical Pharmacy, 12:488-505; Wu y Wu, 1991, Biotherapy, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Arm. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:573-596; Mulligan, 1993, Science, 260:926-932; Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem., 62:191-217; y May, 1993, TIB TECH, 11(5):155- 215); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (véase, por ejemplo, Santerre et al. , 1984, Gene, 30:147-150). Los métodos conocidos habitualmente en la técnica de la tecnología del ADN recombinante que pueden utilizarse se describen en Ausubel et al. (eds.), 1993-2006, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression. A laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds.), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY; y Colberre-Garapin et al., 1981 , J. Mol. Biol., 150:1-14).

Los niveles de expresión de un anticuerpo pueden aumentar mediante la amplificación del vector (para un informe, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, vol. 3 (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo es amplificable, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de células hospedantes aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (véase, por ejemplo, Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol., 3:257-266).

La célula hospedante puede cotransfectarse con dos vectores de expresión, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada, y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener el mismo o diferentes marcadores seleccionables que permitan la expresión igual de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede utilizarse un único vector para codificar ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. En estas situaciones, la cadena ligera generalmente se coloca antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (véase, por ejemplo, Proudfoot, 1986, Nature, 322:562-565; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2197-2199). Las secuencias codificadoras de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Cuando el anticuerpo ha sido expresado de modo recombinante puede purificarse utilizando cualquier método adecuado para la purificación de un anticuerpo, por ejemplo mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, en particular de afinidad por un antígeno específico después de la proteína

A, y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas.

Una referencia exhaustiva para todas la etapas utilizadas para preparar los anticuerpos monoclonales según la presente invencíon es Yokoyama et al., “Production of Monoclonal Antibodies”, Current Protocols in Immunology, unidad 2.5, 2006.

Ejemplos

Ejemplo 1, Afinidad por CD33

Los agentes de unión a CD33 tienen una K_D de afinidad por CD33 humano y de macaco cangrejero de 10 nM o menor en la línea celular HL60 y HEK293-cynomolgus CD33, respectivamente.

Catorce agentes de unión a CD33 (los anticuerpos monoclonales totalmente humanos listados en la tabla 1 como nº 1-14, respectivamente) al CD33 humano y de macao cangrejero se determinaron mediante análisis de Scatchard con FACS según se describe en Brockhoff et al. (Cytometry, 1994, 1 de septiembre,17(1):75-83) sobre células que expresan CD33 (línea celular HL60 derivada de AML, línea celular recombinante HEK293-cynomolgus CD33). Brevemente, se prepararon diluciones de un agente de unión a CD33 en una placa de 96 pocillos, comenzando con 100-400 nM en el primer pocillo (80 µl), seguido de 11 etapas de dilución (1:2, 40 + 40 µl). Se añadieron 50 µl de agente de unión a CD33 a los tubos de FACS, y se añadieron 150 µl de células ($0,8 \times 10^6$/ ml = $1,2 \times 10^5$ células/tubo) a cada tubo de FACS. Las células se mezclaron con suavidad y se incubaron durante 1 h sobre hielo. Después se añadieron 50 µl de anticuerpo secundario conjugado con FITC (concentración de 15 µg/ml; mAb de ratón anti-IgG humana), se mezcló y se incubó durante 30 min en hielo. Después se añadieron 4 ml de PBS, pH 7,2, que contenía ácido al 0,02%, las células se sedimentaron y se resuspendieron en 300 µl de PBS, pH 7,2, y se sometieron a un análisis de FACS utilizando un BD FACS Canto. Todas las etapas experimentales se realizaron sobre hielo húmedo, y todas las diluciones del agente de unión a CD33 se realizaron en PBS/BSA al 0,5% + ácido al 0,02%. La calibración del FACS se realizó utilizando esferas Quantum FITC MESF (Premix) (Bangs Laboratories). Todas las muestras se midieron utilizando los mismos parámetros de FACS. La proporción de IgG unida frente a IgG libre se calculó a partir de los valores de MFI a diferentes concentraciones de agentes de unión a CD33 y se muestran como una transferencia Scatchard. Se trazó una línea de regresión a través de los puntos de datos resultantes, y la pendiente de esta línea se corresponde con el valor negativo de la constante de asociación. Los resultados se listan en la tabla 2.

Tabla 2

nº	Clon nº ID	CD33 humano K_D (nM)	CD33 de macaco cangrejero K_D (nM)
1	280-03-08	0,3	0,03
2	280-21-09	0,4	0,3
3	280-29-12	0,5	0,6
4	280-31-01	0,4	0,3

5	280-31-01(mut)	1	0,5
6	280-34-02	0,3	0,5
7	280-50-01	0,3	0,5
8	280-50-01(mut)	0,4	1,7
9	280-61-07	0,3	0,4
10	283-03-03	0,3	1,9
11	283-05-01	0,2	1,1
12	283-07-03	0,3	2,1
13	283-11-03	0,3	0,6
14	283-14-01	3,2	2,3

Ejemplo 2: Cinética de internalización

La internalización del anticuerpo se refiere a la reducción de la cantidad de complejos de anticuerpo/antígeno sobre la superficie celular de la célula diana después de la incubación con anticuerpo. Los ensayos de internalización se realizaron con la línea celular HL60 que expresa el CD33. Las células se incubaron con una cantidad fija de un agente de unión a CD33 (10 µg/ml de los anticuerpos monoclonales totalmente humanos listados en la tabla 1 como nº 1-14) durante periodos definidos de tiempo (0 h, 1 h, 4 h, 24 h) a 37 °C para permitir la internalización del complejo de anticuerpo/antígeno. En los momentos del tiempo indicados se añadió ácido a la mezcla de incubación para evitar posteriores internalizaciones. Después se añadió una cantidad fija de agente de unión a CD33 para saturar todos los sitios de antígeno de CD33 sobre la superficie celular. La cantidad total de agente de unión a CD33 unida a la superficie celular se determinó mediante un análisis de FACS utilizando un anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con FITC. El momento del tiempo de 0 h se usó para determinar el nivel inicial de complejo de antígeno/anticuerpo de sobre la superficie, y se definió como 100%. Los resultados se listan en la tabla 3 y se ilustran en las figuras 1-3.

Tabla 3

nº	Clon nº ID	Complejo de antígeno/anticuerpo de CD33 que permanecesobre la superficie celular después de 4 h de incubación con anticuerpo (%)
1	280-03-08	49
2	280-21-09	41
3	280-29-12	49
4	280-31-01	44
5	280-31-01(mut)	52
6	280-34-02	44
7	280-50-01	53
8	280-50-01(mut)	55
9	280-61-07	47
10	283-03-03	45
11	283-05-01	51
12	283-07-03	48
13	283-11-03	46

14	283-14-01	47

Se incluye el lintuzumab como anticuerpo de referencia. Los complejos de lintuzumab/CD33 se internalizan con rapidez tras la unión del lintuzumab, lo cual está de acuerdo con los datos publicados. Después de un periodo de incubación de 4 h sólo quedó aproximadamente 20% de la cantidad inicial de los complejos de CD33/lintuzumab sobre la superficie celular. Se pudo demostrar que, de manera inesperada, la internalización de los 14 agentes de unión a CD33 según la presente invención fue frenada comparado con el lintuzumab.

Ejemplo 3: Actividad ADCC

La velocidad de internalización frenada se traduce en una mayor actividad ADCC *in vitro*. Para evaluar el efecto de la internalización frenada sobre la actividad ADCC de los agentes de unión a CD33 (los anticuerpos monoclonales totalmente humanos listados en la tabla 1 como nº 1-14), se incubaron células diana (HL60) con un agente de unión a CD33 durante 0, 1, 4 y 24 h. Posteriormente se realizó un ensayo de ADCC con PBMC estimuladas con IL-2 como células efectoras, y células HL60 revestidas con anticuerpos como células diana. Para todos los experimentos, se empleó una concentración de mAb de 30 µg/ml. El cocultivo de las células efectoras con las células diana en presencia del agente de unión a CD33 se realizó por cuadruplicado o por triplicado en placas de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos en un volumen final de 200 µl de medio de ensayo por pocillo que consiste en suero humano al 10% y BSA al 1% en RPMI en una proporción 1:1. En primer lugar se cultivaron las células efectoras (células PBMC recién aisladas en 100 µl de suero humano al 10% en RPMI por pocillo), seguido de las células diana y una disolución del agente de unión a CD33 (diluida en 50 µl de BSA al 1% en RPMI). Como control, se cultivaron células efectoras en medio de ensayo solo (control de células efectoras), y las células diana se cultivaron en medio de ensayo solo (lisis espontánea) o en medio de ensayo suplementado con Triton X-100 al 1% (lisis máxima). El cocultivo se incubó a 37 °C en un incubador de CO_2 húmedo durante 3 horas. Al final de la incubación, las células se retiraron del medio de cultivo mediante centrifugación (200 x g, es decir, 1000 rpm; 10 min) a temperatura ambiente. Los sobrenadantes exentos de células (100 µl/pocillo) se trasladaron a los correspondientes pocillos de una placa de fondo plano de 96 pocillos. Para determinar la actividad LDH en estos sobrenadantes se añadieron 100 µl de mezcla de reacción (250 µl de catalizador recién mezclado con 11,25 ml de disolución de tinte) a cada pocillo y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Entonces se mide la absorbancia como se describe a continuación.

Se empleó un kit de detección de citotoxicidad (LDH; Roche 11 644 793 001) para medir la actividad ADCC. La detección de la citotoxicidad se basa en la medición de la actividad de la enzima LDH liberada de las células con la membrana plasmática dañada. La LDH liberada hacia los sobrenadantes del cultivo reduce la sal tetrazolio del kit para formar formazano. El máximo de absorción del tinte de formazano se mide a 490 nm frente a una longitud de onda de referencia de 650 nm en un lector de placas de ELISA. Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediada por células, se calculó la absorbancia media de los cultivos realizados por cuadruplicado o por triplicado, y se restó el fondo. Estos valores corregidos se sustituyeron en la siguiente ecuación para calcular la ADCC (%):

(mezcla de células efectoras/diana-control de células efectoras-liberación espontánea) dividido entre (liberación máxima-liberación espontánea)

La actividad ADCC en el momento 0 h (no se preincuba el anticuerpo con las células diana) se define como 100% de actividad ADCC. La actividad ADCC para diversos momentos del tiempo de preincubación del anticuerpo se calculó con relación al momento 0 h y se muestra como citotoxicidad relativa (%).

La internalización frenada de los agentes de unión a CD33, comparado con el lintuzumab, produjo una mayor actividad ADCC comparado con el lintuzumab. En conclusión, una internalización frenada conduce al aumento de la actividad ADCC. La internalización de los agentes de unión a CD33 descritos se correlaciona inversamente con la actividad ADCC de los agentes de unión a CD33, que es indicativo de las ventajas con respecto a la actividad clínica de dichos agentes de unión a CD33. Los resultados se ilustran en la figura 4 para la cinética de internalización en este experimento, y en la figura 5 para la actividad ADCC.

Ejemplo 4: Cartografiado de epitopos

El epitopo de unión de los agentes de unión a CD33 descritos en la presente, con relación al epitopo del lintuzumab, se determinó mediante una espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno (HXMS).

Este método determina la susceptibilidad de los hidrógenos del esqueleto de amida de la proteína de CD33 para intercambiarse con D_2O. Los experimentos se realizaron con la proteína de CD33 recombinante sola, y con la proteína de CD33 con agente de unión a CD33/lintuzumab añadidos (denominado en lo sucesivo en este ejemplo “anticuerpo/anticuerpos”). Así se identifican las regiones de la proteína de CD33 que muestran una protección significativa frente al intercambio debido a la unión del anticuerpo. La resolución del método se determina mediante los péptidos producidos mediante la digestión con pepsina, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos resultante puede ser más grande que el epitopo real del anticuerpo. Estos péptidos derivados de CD33 se identificaron mediante otros experimientos de control con muestras no intercambiadas que emplean las tecnologías de masas y

de HPLC MS/MS precisas convencionales.

Para la muestra de proteína + anticuerpo, la proteína de CD33 y el anticuerpo se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. La proporción molar final de anticuerpo/CD33 fue de 2:1. Utilizando un sistema de robot LEAP (la placa de intercambio se mantiene a 25 °C, la placa de muestra/extinción se mantiene a 4 °C), se añadieron 8 ul de muestra a 80 µl de tampón de intercambio (NaH_2PO_4 10 mM en D_2O, pH = 7, o NaH_2PO_4 10 mM en H_2O, pH = 7), se mezcló y se dejó que intercambiase durante diversos tiempos (15, 60, 120, 240, y 600 segundos) a 25 °C. Entonces se transladaron 80 ul de esta disolución a 80 µl de tampón de extinción (urea 1 M, TCEP-HCl 0,1 M) a 4 °C y se mezcló. Entonces se trasladaron 90 µl de esta disolución a 10 µl de pepsina (4 mg/ml) a 4 °C y se mezcló. Después de 2 minutos se inyectaron 60 µl de esta disolución sobre un cartucho de trampa Michrom C18. El cartucho se lavó con H_2O + TFA al 0,1% durante 2 minutos a 100 µl/min. Entonces se puso en marcha una válvula y el cartucho eluyó sobre una columna Phenomenex Jupiter C5, 1,0 x 50 mm, 5 µm, 300 A. La fase móvil A fue agua/acetonitrilo/TFA (99/0,95/0,05) y la fase móvil B fue acetonitrilo/agua/TFA (95/4,95/0,05). El caudal fue de 100 µl/min. El gradiente fue: 0 minutos (B al 0%), 6 minutos (B al 40%), 7 minutos (B al 40%), 8 minutos (B al 90%), 10 minutos (B al 90%), 11 minutos (B al 0%). El sistema LEAP preenfría la fase móvil hasta 4 °C y también mantiene la columna de trampa y la columna analitica a 4 °C. Para los experimentos de MS (empleados para cuantificar el intercambio con el tampón de D_2O), se empleó un métedo de un único barrido de 300-2000 durante 14 minutos a una resolución de 60.000. Para los experimentos de MS/MS (empleados para identificar péptidos con el tampón de intercambio de H_2O), se empleó un método con 7 barridos durante 14 minutos. El primer barrido fue un barrido de gama completa de 300-2000 con una resolución de 30.000. Los posteriores barridos fueron barridos CID de los 6 iones más intensos del barrido nº 1. El ancho de aislamiento fue de 1,5 amu, la energía de colisión fue de 35 V, y el tiempo de activación fue de 30 mseg. Los péptidos de pepsina se identificaron utilizando los datos de fragmentación y el programa Proteome Discoverer (Thermo). Los péptidos identificados se analizaron utilizando un programa interno que calcula la masa media para los péptidos intercambiados.

Todos los agentes de unión a CD33 protegían el mismo fragmento de péptido con la secuencia de aminoácidos FFHPIPYYDKNSPVHGYW (SEQ ID NO:141) (tabla 4). La secuencia de CD33 protegida por los agentes de unión a CD33 descritos en la presente es diferente y no se solapa con la secuencia peptídica del CD33 protegido por la unión del lintuzumab (MDPNFWLQVQE, SEQ ID NO:142). En la formación de modelos de silicio, que emplea la estructura cristalina de SIGLEC-5, un miembro de la familia SIGLEC homólogo a CD33, se revelaron los epitopos de unión de todos los anticuerpos en el dominio proximal de la proteína, en los que el epitopo de unión del lintuzumab es diferente de los de los agentes de unión a CD33 descritos en la presente. En conclusión, los agentes de unión a CD33 descritos en esta solicitud de patente se unen a un epitopo diferente que el lintuzumab.

Tabla 4

un	Clon nº ID	Epitopo de CD33
1	280-03-08	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
2	280-21-09	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
3	280-29-12	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
4	280-31-01	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
5	280-31-01(mut)	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
6	280-34-02	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
7	280-50-01	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
8	280-50-01(mut)	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
9	280-61-07	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
10	283-03-03	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
11	283-05-01	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
12	283-07-03	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
13	283-11-03	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
14	283-14-01	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
15	lintuzumab	MDPNFWLQVQE

Lista de secuencias

<110> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

<120> Agentes de unión a CD33

<130> 12-0321-PCT

<160> 142

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 1

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 2

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 3

His Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 4

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 5
<211> 8

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 5

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 6

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 7

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

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

<220>
<223> CDR

<400> 8

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 9

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 10

Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 11

Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 12

Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 13

Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 14

Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 15

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

Gly

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 16

Arg Ile Ile Pro Ile Ile Asn Ile Ala Ser Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 17

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

Gly

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 18

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 19

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 20

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

Gly

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 21

Arg Val Ile Pro Ile Ile Gly Ile Ala Ser Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 22

Arg Val Ile Pro Ile Ile Gly Ile Ala Ser Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 23

Arg Val Ile Pro Ile Ile Gly Ile Ala Ser Tyr Ala Gln Asn Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 24

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Asp Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 25

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

Gly

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 26

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 27

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

Gly

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 28

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

Gly

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 29

Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 30

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 31

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> CDR

<400> 32

Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 33

Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 34

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 35

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 36

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 37

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 38

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 39

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 40

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 41

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 42

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 43

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 44

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 45

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 46

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 47

Gln Gln Phe Asp Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 48

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 49

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 50

Gln Gln Phe Asp Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 51

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 52

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 53

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 54

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 55

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 56

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 57

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 58

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 59

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 60

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 61

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 62

Asp Ala Ser Arg Leu Glu Ser
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 63

Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 64

Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 65

Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 66

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 67

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 68

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 68

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 69

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 70

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 71

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
1 5 10

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 72

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

<210> 73
<211> 11

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 73

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

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 74

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 75

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
1 5 10

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 76

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

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 77

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
1 5 10

<210> 78
<211> 11
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 78

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
1 5 10

<210> 79
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 79

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
1 5 10

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 80

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

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 81

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

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 82

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

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 83

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

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 84

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

<210> 85
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 85

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 86
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> VH

<400> 86

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
            100                 105                 110
Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 87
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 87

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

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

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

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

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

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

Ala Arg His Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 88
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 88

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 89
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 89

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
            100                 105                 110
Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 90
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 90

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Val Gly Ile Val Asn Tyr Ala Glu Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 91
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 92
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 92

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 93
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 94
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 94

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Asp Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 95
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 95

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asp Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 96
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 96

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 97
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 97

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

Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asp Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 98

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 99
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 99

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 100
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 100

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 101
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> VL

<400> 101

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 102
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 102

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 103
<211> 107

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 103

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

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

<210> 104
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 104

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Thr Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95

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

<210> 105
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 105

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val
            20                  25                  30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 106
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 106

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

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

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

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

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

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

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

<210> 107
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 107

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 108
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 108

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 109
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 109

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 110

<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 110

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
            20                  25                  30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Met Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 111
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 111

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 112
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 112

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

<210> 113
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 113

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Val 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

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 Arg 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 Glu Glu Met 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 Lys
        435                 440                 445
```

<210> 114
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 114

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

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

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

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

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

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

```
Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
            100                 105                 110

Val 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

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 Arg 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 Glu Glu Met 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 Lys
435 440 445

<210> 115
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 115

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

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

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

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

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

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

Ala Arg His Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

```
Val 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

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 Arg 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 Glu Glu Met 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 Lys
        435                 440                 445
```

<210> 116
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 116

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Val 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

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 Arg 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 Glu Glu Met 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 Lys
        435                 440                 445
```

<210> 117
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 117

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Val 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

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 Arg 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 Glu Glu Met 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 Lys
        435                 440                 445
```

<210> 118

<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 118

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Val Gly Ile Val Asn Tyr Ala Glu Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Val 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

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 Arg 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 Glu Glu Met 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 Lys
        435                 440                 445
```

<210> 119
<211> 447
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 119

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

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

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

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

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

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

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

Val 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
```

```
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 Arg 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 Glu Glu Met 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 Lys
        435                 440                 445
```

<210> 120
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 120

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

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

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

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

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

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

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

Val 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

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 Arg 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 Glu Glu Met 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 Lys
        435                 440                 445
```

<210> 121
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 121

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

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

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

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

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

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

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

Val 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

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 Arg 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 Glu Glu Met 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 Lys
        435                 440                 445
```

<210> 122
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 122

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Asp Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
```

<210> 123
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 123

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asp Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
```

<210> 124
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 124

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
```

<210> 125
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 125

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

Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asp Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
```

<210> 126
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH

<400> 126

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
```

<210> 127
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 127

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 128
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 128

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 129
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 129

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 130
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 130

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 131
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 131

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 132
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 132

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Thr Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 133
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 133

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 134
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 134

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 135
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 135

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 136
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 136

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 137
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 137

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 138
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 138

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 139
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 139

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 140
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL

<400> 140

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 141
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Intervalo epitópico

<400> 141

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

Tyr Trp

<210> 142
<211> 11
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Intervalo epitópico

<400> 142

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu
1 5 10

REIVINDICACIONES

1.- Un agente de unión a CD33 que se une al CD33 humano, siendo el agente de unión a CD33 un anticuerpo o un derivado de un anticuerpo, definido por unirse específicamente a un epítopo dentro de la secuencia de aminoácidos FFHPIPYYDKNSPVHGYW (SeqID No: 141) de CD33 humano.

2.- Un agente de unión a CD33 según la reivindicación 1, caracterizado por tener una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR4, CDR5 y CDR6, en el que CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:1-14, CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:15-28, CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:29-42, CDR4 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:43-56, CDR5 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:57-70, CDR6 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:71-84.

3.- Un agente de unión a CD33 según la reivindicación 1 o 2, en el que el epitopo se determina mediante una espectroscopía de masas de intercambio de hidrógeno.

4.- Un agente de unión a CD33 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cinética de internalización del agente de unión a CD33 es tal que al menos 40% de la cantidad inicial del agente de unión a CD33 permanece sobre la superficie celular a las 4 horas después de la incubación.

5.- Un agente de unión a CD33 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:85-98, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:99-112.

6.- Un agente de unión a CD33 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de unión a CD33 tiene una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:113-126, y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:127-140.

7.- Un agente de unión a CD33 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de unión a CD33 tiene afinidad por el CD33 humano y por el CD33 de macaco cangrejero, con una K_D igual o menor que 10 nM.

8.- Un agente de unión a CD33 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de unión a CD33 está humanizado.

9.- Un agente de unión a CD33 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de unión a CD33 es totalmente humano.

10.- Un agente de unión a CD33 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de unión a CD33 comprende además una función efectora.

11.- Un agente de unión a CD33 según la reivindicación 10, en el que la función efectora es mediada por un dominio F_c.

12.- Un agente de unión a CD33 según la reivindicación 10, en el que el agente de unión a CD33 comprende una o más mutaciones en el dominio F_c que modulan la función del dominio F_c.

13.- Un agente de unión a CD33 según la reivindicación 12, en el que la modulación de la función del dominio Fc es un aumento de la ADCC en al menos 10%, preferiblemente 50%, y más preferiblemente 100%.

14.- Un agente de unión a CD33 según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que las mutaciones en el dominio F_c se localizan en una o más posiciones seleccionadas de los aminoácidos en las posiciones 332 y/o 239 y/o 236 según el índice de numeración de EU de Kabat.

15.- Un agente de unión a CD33 según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que las mutaciones en el dominio F_c son una combinación de sustituciones en las posiciones 239 y 332, preferiblemente S239D/I332E.

16.- Un agente de unión a CD33 seleccionado de

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:1, una CDR2 de SEQ ID NO:15, una CDR3 de SEQ ID NO:29, una CDR4 de SEQ ID NO:43, una CDR5 de SEQ ID NO:57, y una CDR6 de SEQ ID NO:71,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:2, una CDR2 de SEQ ID NO:16, una CDR3 de SEQ ID NO:30, una CDR4 de SEQ ID NO:44, una CDR5 de SEQ ID NO:58, y una CDR6 de SEQ ID NO:72,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:3, una CDR2 de SEQ ID NO:17, una CDR3 de SEQ ID NO:31, una CDR4 de SEQ ID NO:45, una CDR5 de SEQ ID NO:59, y una CDR6 de SEQ ID NO:73,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:4, una CDR2 de SEQ ID NO:18, una CDR3 de SEQ ID

NO:32, una CDR4 de SEQ ID NO:46, una CDR5 de SEQ ID NO:60, y una CDR6 de SEQ ID NO:74,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:5, una CDR2 de SEQ ID NO:19, una CDR3 de SEQ ID NO:33, una CDR4 de SEQ ID NO:47, una CDR5 de SEQ ID NO:61, y una CDR6 de SEQ ID NO:75,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:6, una CDR2 de SEQ ID NO:20, una CDR3 de SEQ ID NO:34, una CDR4 de SEQ ID NO:48, una CDR5 de SEQ ID NO:62, y una CDR6 de SEQ ID NO:76,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:7, una CDR2 de SEQ ID NO:21, una CDR3 de SEQ ID NO:35, una CDR4 de SEQ ID NO:49, una CDR5 de SEQ ID NO:63, y una CDR6 de SEQ ID NO:77,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:8, una CDR2 de SEQ ID NO:22, una CDR3 de SEQ ID NO:36, una CDR4 de SEQ ID NO:50, una CDR5 de SEQ ID NO:64, y una CDR6 de SEQ ID NO:78,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:9, una CDR2 de SEQ ID NO:23, una CDR3 de SEQ ID NO:37, una CDR4 de SEQ ID NO:51, una CDR5 de SEQ ID NO:65, y una CDR6 de SEQ ID NO:79,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:10, una CDR2 de SEQ ID NO:24, una CDR3 de SEQ ID NO:38, una CDR4 de SEQ ID NO:52, una CDR5 de SEQ ID NO:66, y una CDR6 de SEQ ID NO:80,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:11, una CDR2 de SEQ ID NO:25, una CDR3 de SEQ ID NO:39, una CDR4 de SEQ ID NO:53, una CDR5 de SEQ ID NO:67, y una CDR6 de SEQ ID NO:81,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:12, una CDR2 de SEQ ID NO:26, una CDR3 de SEQ ID NO:40, una CDR4 de SEQ ID NO:54, una CDR5 de SEQ ID NO:68, y una CDR6 de SEQ ID NO:82,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:13, una CDR2 de SEQ ID NO:27, una CDR3 de SEQ ID NO:41, una CDR4 de SEQ ID NO:55, una CDR5 de SEQ ID NO:69, y una CDR6 de SEQ ID NO:83,

un anticuerpo que comprende una CDR1 de SEQ ID NO:14, una CDR2 de SEQ ID NO:28, una CDR3 de SEQ ID NO:42, una CDR4 de SEQ ID NO:56, una CDR5 de SEQ ID NO:70, y una CDR6 de SEQ ID NO:84.

17.- Un agente de unión a CD33 seleccionado de

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:85 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:99,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:86 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:100,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:87 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:101,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:88 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:102,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:89 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:103,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:90 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:104,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:91 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:105,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:92 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:106,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:93 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:107,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:94 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:108,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:95 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:109,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:96 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:110,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:97 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:111,

un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:98 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:112.

18.- Un agente de unión a CD33 seleccionado de un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:113 y una cadena ligera de SEQ ID NO:127,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:114 y una cadena ligera de SEQ ID NO:128,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:115 y una cadena ligera de SEQ ID NO:129,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:116 y una cadena ligera de SEQ ID NO:130,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:117 y una cadena ligera de SEQ ID NO:131,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:118 y una cadena ligera de SEQ ID NO:132,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:119 y una cadena ligera de SEQ ID NO:133,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:120 y una cadena ligera de SEQ ID NO:134,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:121 y una cadena ligera de SEQ ID NO:135,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:122 y una cadena ligera de SEQ ID NO:136,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:123 y una cadena ligera de SEQ ID NO:137,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:124 y una cadena ligera de SEQ ID NO:138,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:125 y una cadena ligera de SEQ ID NO:139,

un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:126 y una cadena ligera de SEQ ID NO:140.

19.- Un agente de unión a CD33 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el agente de unión a CD33 comprende además una función efectora.

20.- Un agente de unión a CD33 de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la función efectora está mediada por un dominio Fc.

21.- Un agente de unión a CD33 según la reivindicación 19, en el que el agente de unión a CD33 comprende una o más mutaciones en el dominio Fc que modulan la función del dominio Fc.

22.- Un agente de unión a CD33 de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la modulación de la función del dominio Fc es un aumento de ADCC en al menos 10%, preferiblemente 50% y más preferiblemente 100%.

23.- Un agente de unión a CD33 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-22, en el que las mutaciones en el dominio Fc están situadas en una o más posiciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 332 y / o 239 y / o 236 de acuerdo con el índice de numeración EU de Kabat.

24.- Un agente de unión a CD33 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-23, en el que las mutaciones en el dominio Fc son una combinación de sustituciones en las posiciones 239 y 332, preferiblemente S239D / I332E.

25.- Una molécula de ADN que comprende una región que codifica la región variable de cadena pesada de un agente de unión a CD33 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

26.- Una molécula de ADN que comprende una región que codifica la región variable de cadena ligera de un agente de unión a CD33 según cualquiera de las reivindicaciones 1-24.

27.- Un vector de expresión que contiene una molécula de ADN de la reivindicación 25 ó 26.

28.- Una célula hospedante que porta uno o más vectores de la reivindicación 27.

29.- Un método para producir un agente de unión a CD33 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, que comprende transfectar una célula hospedante con uno o más vectores de la reivindicación 27, cultivar la célula hospedante, y recuperar y purificar la molécula de anticuerpo.

30.- Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, uno o más agentes de unión a CD33 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, y al menos un vehículo fisiológicamente aceptable.

31.- La composición farmacéutica de la reivindicación 30, que comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales.

32.- La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 30-31, para disminuir el número de células que expresan el CD33 sobre su superficie.

33.- La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 30-31, para uso en el tratamiento de malignidades de células mieloides y del síndrome mielodisplásico (MDS).

34.- La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 33, en la que dicha malignidad mieloide se selecciona de leucema mieloide aguda y leucemia mieloide crónica.

35.- La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 30-31, para el uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunológicas e inflamatorias que implican a las células mieloides en su patología.

Figura 1

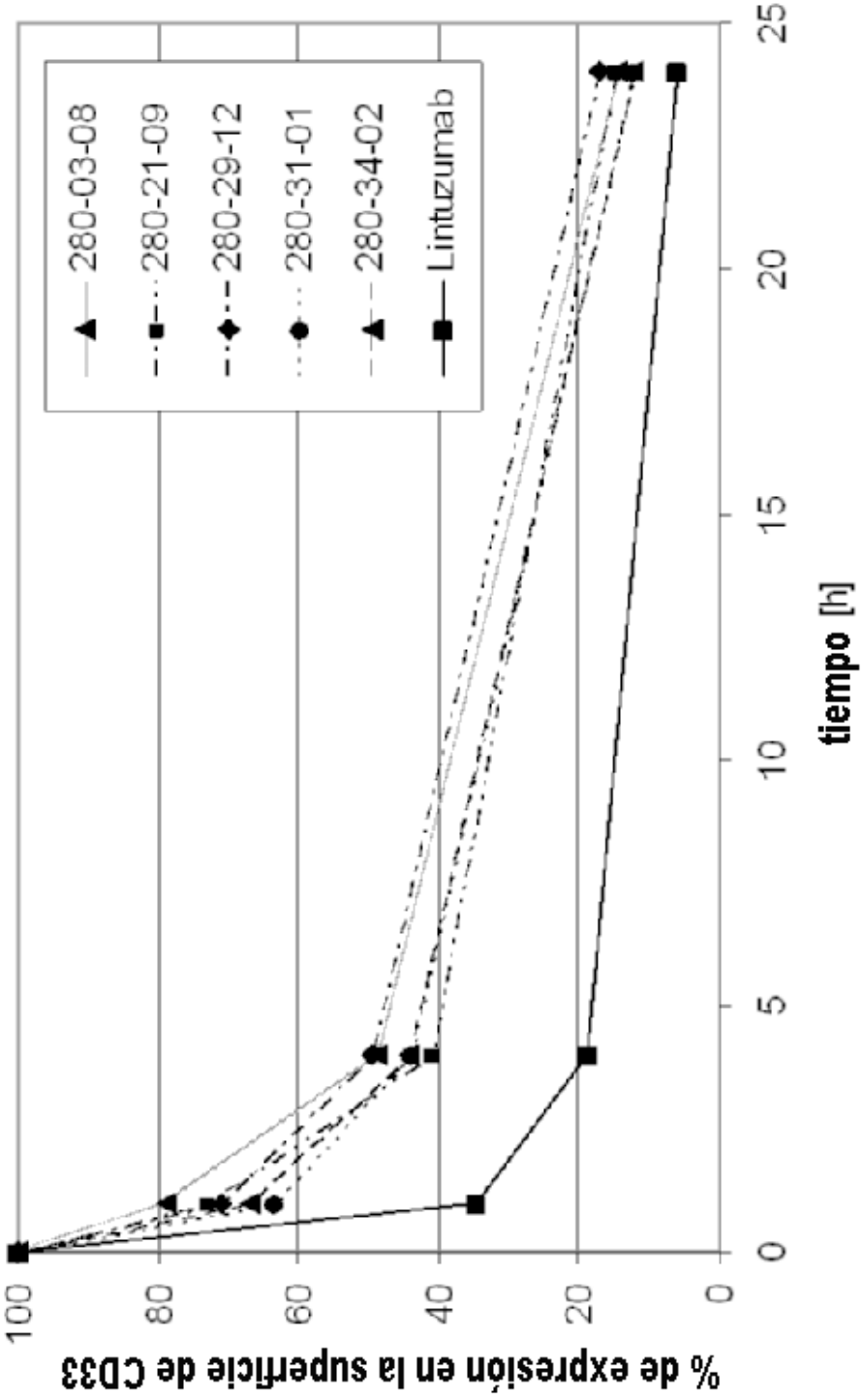

% de expresión en la superficie de CD33
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
tiempo [h]
280-03-08
280-21-09
280-29-12
280-31-01
280-34-02
Lintuzumab

Figura 2

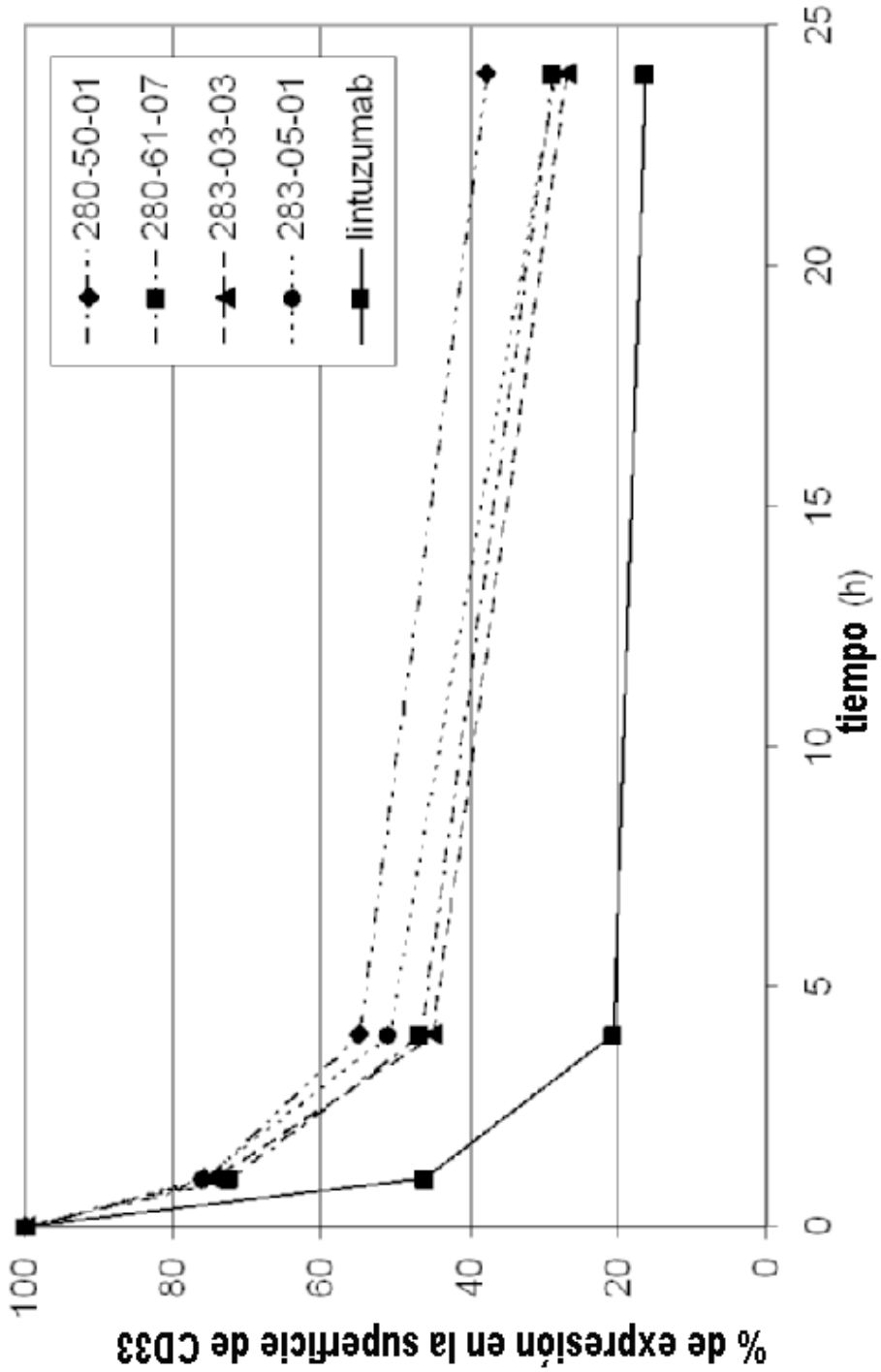

% de expresión en la superficie de CD33
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
tiempo (h)
280-50-01
280-61-07
283-03-03
283-05-01
lintuzumab

Figura 3

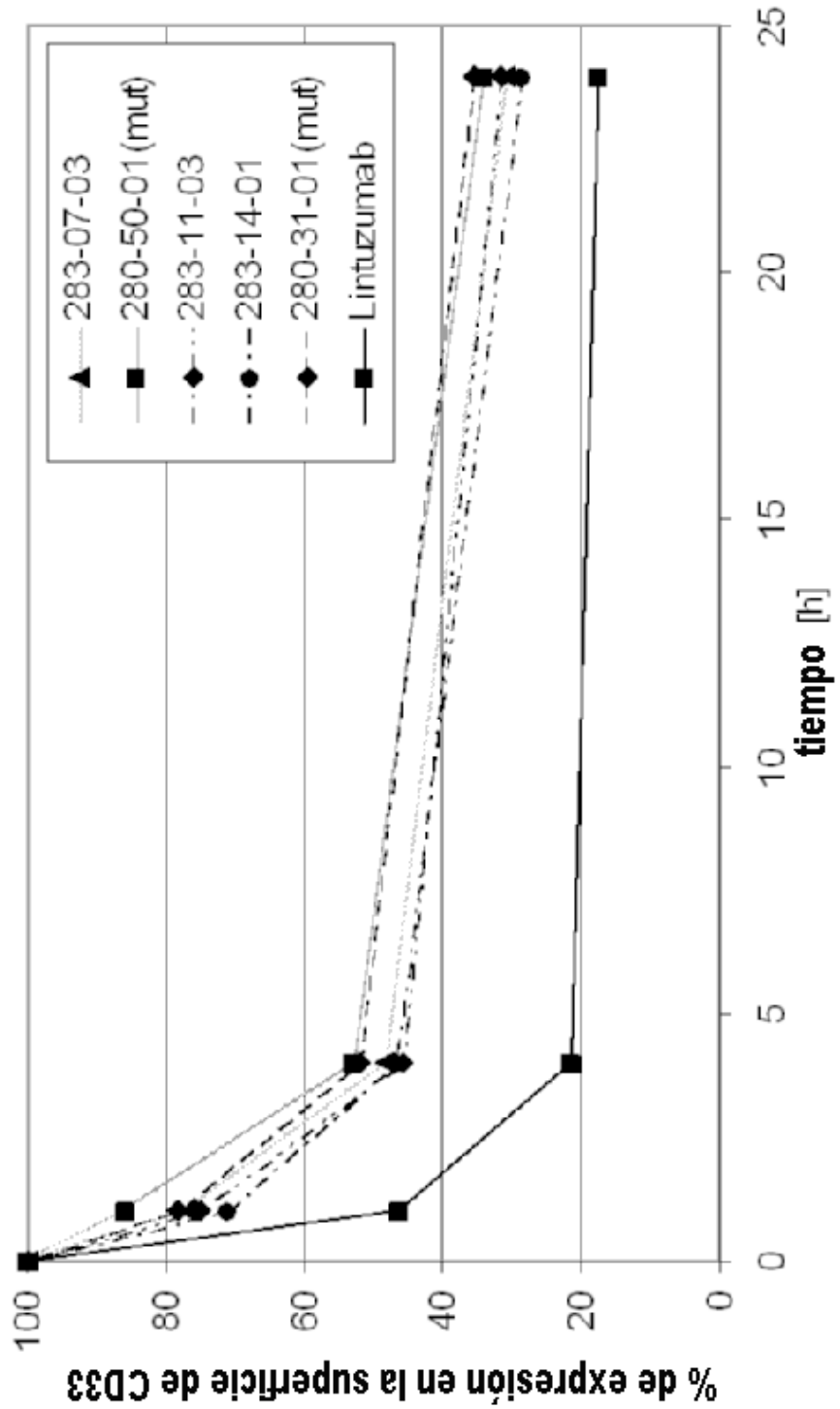

% de expresión en la superficie de CD33
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
tiempo [h]
283-07-03
280-50-01 (mut)
283-11-03
283-14-01
280-31-01 (mut)
Lintuzumab

Figura 4

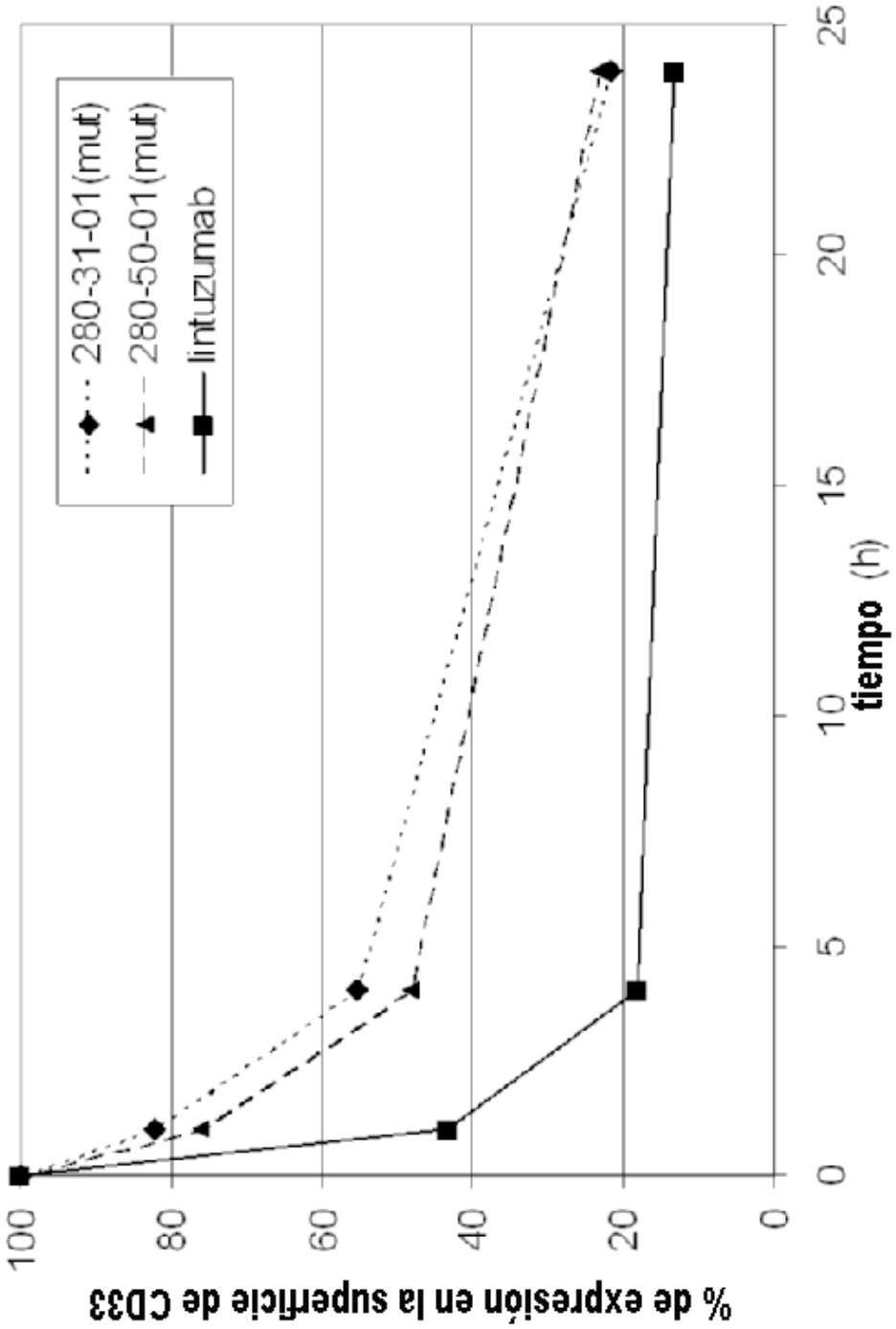
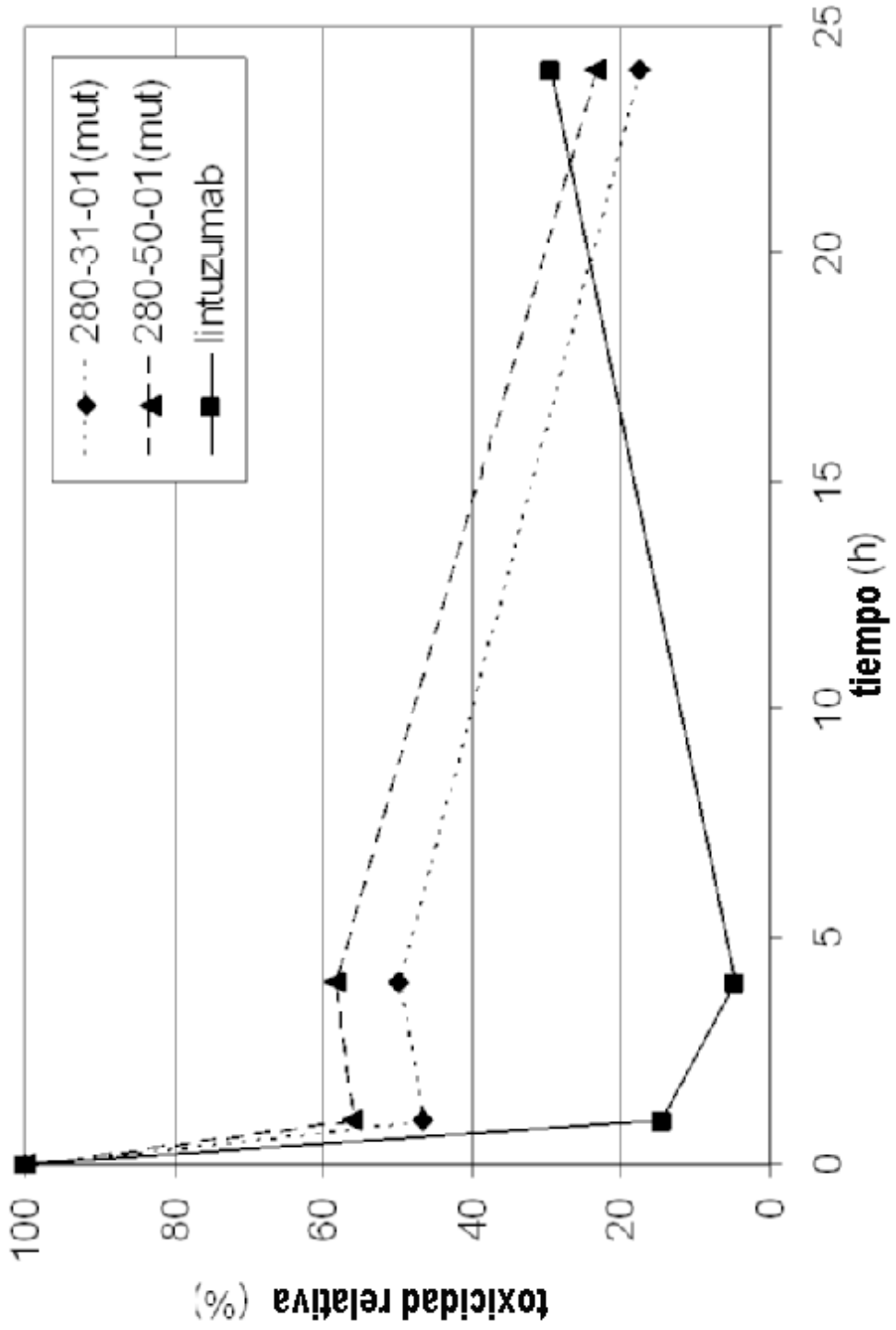

280-31-01(mut)
280-50-01(mut)
lintuzumab
% de expresión en la superficie de CD33
tiempo (h)
0
20
40
60
80
100
0
5
10
15
20
25

Figura 5


280-31-01 (mut)
280-50-01 (mut)
lintuzumab
toxicidad relativa (%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
tiempo (h)