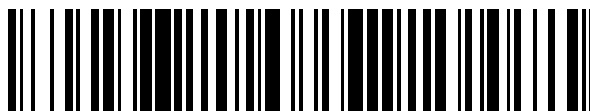


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 348**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2015** **PCT/IL2015/050133**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015** **WO15118538**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2015** **E 15709365 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** **EP 3102607**

54 Título: **Anticuerpos anti CD84, composiciones que comprenden los mismos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

06.02.2014 US 201461936361 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.01.2019

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
at the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**SHACHAR, IDIT;
BINSKY, INBAL y
MAROM, AYELET**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 696 348 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti CD84, composiciones que comprenden los mismos y usos de los mismos

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere a anticuerpos anti CD84, a composiciones que comprenden los mismos y a usos de los mismos.

En individuos normales, el conjunto de linfocitos periféricos es de tamaño constante. El control de la homeostasis linfóide es el resultado de un equilibrio muy fino entre la producción, la supervivencia y la proliferación de linfocitos. Se ha demostrado que los factores de supervivencia desempeñan una función crítica en el mantenimiento de la homeostasis de los linfocitos.

La leucemia linfocítica crónica, la leucemia más frecuente en el mundo occidental, se caracteriza por la acumulación progresiva de pequeños linfocitos maduros CD5⁺, en la sangre periférica, órganos linfoides y médula ósea. La señal de identidad de la enfermedad es la disminución de la apoptosis, que da lugar a la acumulación de estas células malignas. A pesar de los grandes avances en los últimos años en la comprensión de la biología y la fisiopatología de la enfermedad, así como en el desarrollo de mejores modalidades de tratamiento, la CLL sigue siendo incurable en la mayoría de los pacientes, e incluso el control de la enfermedad requiere un tratamiento agresivo con efectos secundarios significativos. Una mejor comprensión de los fenómenos celulares involucrados en la patogenia y la evolución de la enfermedad debería conducir a tratamientos más específicos y menos tóxicos, con un tratamiento inicial en pacientes en riesgo, que posiblemente permiten curaciones.

CD84 es un miembro del subconjunto CD2 de la superfamilia de inmunoglobulinas de las moléculas de la superficie celular. Es una proteína de la superficie celular monocatenaria con una porción extracelular de 199 aa, que contiene cuatro sitios potenciales de N-glucosilación. La región transmembranal consta de 25 aa, y la cola citoplasmática de 83 aa contiene cuatro tirosinas [de la Fuente *et al. Blood*. 1997; 90: 2398-2405]. El CD84 humano es 57,3% idéntico al CD84 murino. CD84 es expresado predominantemente por linfocitos B, linfocitos T, plaquetas, monocitos, células dendríticas (CD) y CD84 también se expresa inicialmente en la hematopoyesis [Calpe *et al. Advances in Immunology*, vol. 97. 2008; 97: 177-250].

Los presentes inventores han demostrado previamente que la expresión de CD84 es significativamente elevada desde las etapas iniciales de la enfermedad y está regulada por el factor inhibidor de la migración de macrófagos y su receptor, CD74. La activación de la superficie celular CD84 inicia una cascada de señalización que mejora la supervivencia de las células de CLL. Tanto la modulación por disminución de la expresión de CD84 como su bloqueo inmunomediado provocan la muerte celular *in vitro* e *in vivo*. Además, el análisis de muestras procedentes de un estudio clínico en curso, en el que se trataron pacientes humanos con anti-CD74 humanizado (milatuzumab), muestra una disminución en las concentraciones de ARN mensajero de CD84 y proteínas en células tratadas con milatuzumab. Esta disminución a la baja se correlacionó con la reducción de la expresión de Bcl-2 y Mcl-1. Por lo tanto, la sobreexpresión de CD84 en CLL es un mecanismo de supervivencia importante que parece ser un fenómeno inicial en la patogenia de la enfermedad (Binsky-Ehrenreich *et al. E. Pub.* 25 de febrero de 2013 *Oncogene*).

El documento WO2010/035259 da a conocer CD84 como una proteína reguladora que es esencial para la supervivencia de las células de la CLL. En base a este resultado, los inventores del documento WO2010/035259 han sugerido el uso de CD84 como diana para el tratamiento de B-CLL y como marcador para la enfermedad.

Técnica relacionada adicional:

La Solicitud de patente de EE.UU. n° 20050027114 describe métodos para tratar enfermedades tales como la leucemia crónica agonizando o antagonizando una actividad de un polipéptido similar a CD84.

La solicitud de patente de EE.UU. n° 20050025789 describe el tratamiento o la profilaxis de tumores en pacientes, utilizando una célula tumoral que expresa polipéptidos coestimuladores (p. ej., CD84) para producir una vacuna destinada a aumentar la actividad lítica de los linfocitos NK.

Compendio de la invención

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un anticuerpo aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que se une específicamente a CD84 y:

(i) disminuye la actividad antiapoptótica de células de estroma en células de leucemia linfocítica crónica (CLL); y/o

(ii) induce la movilización de células de CLL desde la médula ósea.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un anticuerpo aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que comprende regiones determinantes de complementariedad como se expone en las SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5 y NO: 6 (B4), en donde el

anticuerpo se une específicamente a CD84.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un anticuerpo aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígenos que comprende regiones determinantes de complementariedad como se expone en las SEQ ID NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11 y NO: 12 (B1), en donde el anticuerpo se une específicamente a CD84.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado disminuye la actividad antiapoptótica de células estromales en las células de leucemia linfocítica crónica (CLL).

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado inhibe la secreción de CCL3 en células de CLL.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado inhibe la expresión de BCL-2 en células de CLL y estromales.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado inhibe la expresión de Bcl-2 del estroma, reduciendo así el efecto antiapoptótico del estroma en la CLL.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado reduce la expresión de citocinas como IL-6 e IL-8 en células estromales que apoyan la supervivencia de CLL.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado induce la movilización de células de CLL procedentes de la médula ósea.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado es una IgG.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo híbrido.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para inducir apoptosis en linfocitos B de un sujeto que tiene una neoplasia maligna de linfocitos B, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, induciendo así la apoptosis en linfocitos B del sujeto.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, tratando así la neoplasia maligna de linfocitos B.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona el uso del anticuerpo en la fabricación de un medicamento identificado para el tratamiento de una neoplasia maligna de linfocitos B.

Según algunas realizaciones de la invención, la neoplasia maligna de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en un linfoma, una leucemia y un mieloma.

Según algunas realizaciones de la invención, la neoplasia maligna de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en un linfoma de Hodgkin, un linfoma no hodgkiniano, un linfoma difuso de linfocitos B grandes, una leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL)/leucemia linfocítica crónica (CLL), una leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, una leucemia mielocítica crónica (LMC), un linfoma de linfocitos B de la zona marginal extraganglionar - linfoma del tejido linfocítico asociado a la mucosa, un linfoma folicular, un linfoma de células del manto, un linfoma de linfocitos B de la zona marginal ganglionar, un linfoma de Burkitt, una leucemia de tricoleucocitos, un linfoma primario del sistema nervioso central, un linfoma de linfocitos B de la zona marginal esplénica, un linfoma linfoplasmocítico, un linfoma primario mediastínico de linfocitos B, un mieloma múltiple, una leucemia linfocítica aguda (LLA), una leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B precursores, una leucemia de células plasmáticas, una leucemia de linfocitos B precursores, una leucemia prematura de linfocitos B precursores y una leucemia linfoblastoide aguda de linfocitos B precursores.

Según algunas realizaciones de la invención, la neoplasia maligna de linfocitos B es una B-CLL.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para diagnosticar B-CLL en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12 en condiciones que permitan la formación de inmunocomplejos entre la isoforma C de CD84 (SEQ ID NO: 14) y el anticuerpo; y

(b) determinar un nivel de los inmunocomplejos en la muestra biológica, en donde un aumento en el nivel de los

inmunocomplejos más allá de un umbral predeterminado con respecto al nivel de los inmunocomplejos en una muestra biológica de un individuo sano es indicativo de la B-CLL.

Según algunas realizaciones de la invención, la determinación se efectúa en la proteína.

- 5 Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además corroborar el diagnóstico usando un ensayo de diagnóstico seleccionado de la expresión del marcador de superficie distintivo de la isoforma c de CD84, el análisis del cariotipo y las mutaciones de la estirpe germinativa.

Según algunas realizaciones de la invención, un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido aislado es el expuesto en la SEQ ID NO: 26 o NO: 27.

- 10 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para identificar un supuesto fármaco contra una neoplasia maligna de linfocitos B, comprendiendo el método:

(a) tratar un modelo animal que tiene una neoplasia maligna de linfocitos B con un agente de prueba; y

- (b) detectar células de neoplasia maligna de linfocitos B en un tejido periférico en comparación con una médula ósea del modelo animal tratado como en (a), en donde un aumento en la proporción en comparación con la relación antes del tratamiento es indicativo de que el agente de prueba es un supuesto fármaco contra la neoplasia maligna de linfocitos B.

Según algunas realizaciones de la invención, el agente de prueba es un anticuerpo anti CD84.

Según algunas realizaciones de la invención, el modelo animal se selecciona del grupo que consiste en un modelo de xenoinjerto inducido por trasplante de CLL humana en ratones y el modelo murino Eu-TCL1.

- 20 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y/o científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden usar en la práctica o la experimentación de las realizaciones de la invención, a continuación se describen métodos y/o materiales a modo de ejemplos. En caso de conflicto, la memoria de la patente, incluidas las definiciones, prevalecerán. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean necesariamente restrictivos.

Breve descripción de los dibujos

- Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se subraya que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de exposición ilustrativa de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

- Las figuras 1A-D son gráficos de dispersión que muestran la capacidad del anticuerpo anti-CD84 bloqueador del hibridoma B4 para inducir la muerte celular de CLL. Figuras 1A-B - Se incubaron 1×10^7 células de CLL con anti-CD84 del hibridoma B4 (5 $\mu\text{g/ml}$) o un anticuerpo de referencia (IgG2a). 24 h después, se analizó la muerte celular de CLL mediante tinción con Anexina 7AAD. Se presentan gráficos representativos de 10 experimentos independientes. Figuras 1C-D - Se cultivaron $1,6 \times 10^6$ células de CLL junto con 1×10^5 M210B4, en presencia o ausencia del anti-CD84 del hibridoma B4 (5 $\mu\text{g/ml}$), o un anticuerpo de referencia. Después de 48 h, se determinó la muerte celular de CLL con tinción con Anexina 7AAD. Se presentan gráficos representativos de 3 experimentos independientes.

- Las figuras 2A-C son gráficos de barras que muestran la capacidad del anti-CD84 del hibridoma B4 para mediar un efecto antiapoptótico en células estromales de médula ósea M210B4 en cultivos conjuntos. Además, las interacciones homofílicas de CD84 expresadas en células de CLL y del estroma producen la secreción de citocinas del estroma con el fin de apoyar aún más la supervivencia de las células de CLL. Se cultivaron células M210B4 (1×10^5) junto con células de CLL en presencia o ausencia del anti-CD84 del hibridoma B4 o un anticuerpo control de isotipo. 48 h después, se recogieron las células y se analizaron las concentraciones de Bcl-2, IL-6 y de ARNm de VCAM-1 por qRT-PCR. Los resultados presentados son un resumen de n experimentos independientes y se expresan en número de veces de cambio en la expresión en células M210B4 cocultivadas en comparación con las células cocultivadas bloqueadas por CD84 y para las células M210B4 (solo estroma), que se definió como 1. (Figura 2A) Número de veces de cambio en la expresión de Bcl-2, n = 4, P = 0,037 (Figura 2B) número de veces de cambio en la expresión de IL6, n = 5, P = 0,037 (Figura 2C) número de veces de cambio en la expresión de VCAM-1 n = 6, P = 0,25.

La Fig. 3 es un gráfico de barras que demuestra que el CD84 regula la secreción de CCL3 en cultivos conjuntos. Se cultivaron $1,6 \times 10^6$ células de LLC con 1×10^5 células M210B4 en presencia o ausencia del anticuerpo anti-CD84 del hibridoma B4 o un anticuerpo control de isotipo (5 µg/ml). 48 h después, se analizó por ELISA la concentración de CCL3 en el medio acondicionado. Los gráficos muestran el número de veces de cambio en las concentraciones de CCL3 después del bloqueo de CD84. El gráfico resume 6 experimentos, * P = 0,02.

Las figuras 4A-H demuestran que los anticuerpos de algunas realizaciones de la invención son superiores en la destrucción de linfocitos B-CLL en comparación con el anticuerpo F8, según se determina por el ensayo de apoptosis Magic Red. Figuras 4A-D - Las células CLL purificadas se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^7 células/pocillo en medio RPMI enriquecido con FCS al 10%, glutamato 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, con o sin sobrenadante derivado de hibridoma anti-CD84 (F8/B1/B4) o hibridoma de referencia durante 24 h. Las células se centrifugaron, se lavaron y se incubaron con Magic Red (Immunochemistry Technology) según las instrucciones del fabricante, a 37°C durante 1 h. A continuación, se midió la tinción con Magic Red mediante análisis FACS. Figuras 4E-H - Se cultivaron células Ramos en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^7 células/pocillo en medio RPMI enriquecido con FCS al 10%, glutamato 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, con o sin sobrenadante procedente de hibridoma anti-CD84 (F8/B1/B4) o hibridoma de referencia durante 24 h. Las células se centrifugaron, se lavaron y se incubaron con Magic Red (Immunochemistry Technology) según las instrucciones del fabricante, a 37°C durante 1 h. A continuación, se midió la tinción de Magic Red por análisis FACS.

Las figuras 5A-B son diagramas de dispersión que muestran un número reducido de células CLL en M.O. de ratones CD84KO. Se tiñeron 1×10^7 células de CLL con CFSE y se inyectaron iv en ratones C57BL/6 WT o CD84KO. Después de 1 h (Figura 5B) y 4 h (Figura 5A), los ratones se sacrificaron y se analizaron por FACS el número de células de CLL en bazo y M.O. Los gráficos muestran la proporción de células marcadas recuperadas de la M.O. al número de células recuperadas de los bazo de 16 ratones en cada grupo (Figura 5A). * P = 0,0005 o (Figura 5B) 6 ratones en cada grupo, sin diferencia estadística significativa entre los grupos.

Las figuras 6A-M demuestran que los anticuerpos B1 y B4 reconocen células murinas procedentes de ratones TCL-1. Figura 6A es un histograma que muestra la expresión de CD84 (línea negra) o la tinción con un anticuerpo control de isotipo coincidente (línea gris) en linfocitos B220+CD5+ procedentes de ratones TCL-1; las figuras 6B-D son gráficos de puntos que muestran el porcentaje de B220+CD5+ en células esplénicas procedentes de ratones TCL-1 de 18, 11 y 6 meses de edad; y las figuras 6E-M son gráficos de puntos. Se incubaron 1×10^7 linfocitos B220+CD5+ procedentes de ratones esplénicos TCL-1 con los anticuerpos (IgG2a) B1 o B4 o un control de isotipo coincidente. 48 h después, se analizó la muerte celular mediante tinción con anexina-7AAD.

Las figuras 7A-D presentan la evaluación del potencial terapéutico de los anticuerpos B1 y B4 en diferentes estirpes de células tumorales. La figura 7A ilustra las concentraciones de ARNm de CD84 y actina que se analizaron en diferentes tumores sólidos: MDA435 (cáncer de mama humano), PC-3 (cáncer de próstata humano), Hela (cáncer de cuello uterino humano), A375 (melanoma maligno humano), A549 (adenocarcinoma pulmonar humano), PAC1 (cáncer de páncreas humano) y N87 (cáncer gástrico humano); la figura 7B es un histograma que muestra la expresión de CD84 (línea negra) o la tinción con un anticuerpo de isotipo coincidente (línea gris) en células Daudi; las figuras 7C-D muestran 1×10^7 células Daudi que se incubaron con el anticuerpo B1 o B4, o un anticuerpo de referencia (IgG2a). 48 h después, la muerte celular se analizó mediante tinción con anexina-7AAD. El gráfico resume 7 experimentos independientes, que muestran el número de veces de cambio en las células positivas a Anexina en comparación con las células Daudi incubadas con un anticuerpo control de isotipo coincidente.

Las figuras 8A-F muestran una expresión elevada de CD84 en células de CLL. (Figura 8A) Se purificaron linfocitos B procedentes de sujetos sanos (normales; N = 4), así como pacientes con CLL en fase inicial (N = 6) y avanzada (N = 6) y se examinó la expresión de CD84. CD84 y ARNm de actina se analizaron por RT-PCR; (Figura 8B) se realizó la qRT-PCR utilizando cebadores para CD84 y RP-2. Los resultados se expresan en número de veces de cambio en el ARNm de CD84 en células de CLL en comparación con linfocitos B normales, que se definió como 1. El gráfico resume los resultados de tres donantes normales y siete pacientes con CLL; (figuras 8C-E) Histogramas que muestran la expresión de CD84 (línea gris) o tinción con Ab secundario solo (línea de puntos) en linfocitos B normales y células CLL. Los gráficos resumen los resultados de 4 donantes normales y 18 pacientes con CLL en porcentaje o MFI; (Figura 8F) Los gráficos de puntos muestran la expresión de CD84 y CD5 en células positivas a CD19 normales (N = 3) y células CLL (N = 4).

Las figuras 9A-J demuestran que los anticuerpos B1 y B4 no provocan apoptosis en los linfocitos B normales. Se incubaron 1×10^7 células esplénicas B220+ procedentes de ratones C57BL/6 de 6, 8 y 11 meses de edad con los anticuerpos B1 o B4 o una referencia (IgG2a). 48 h después, se analizó la muerte celular mediante tinción con anexina-7AAD. Los gráficos resumen 3 experimentos independientes, que muestran el número de veces de cambio en los linfocitos B220+ vivos incubados con B1, B4 o un anticuerpo control de isotipo coincidente.

Las figuras 10A-B demuestran que CD84 se expresa en células de estroma. (Figura 10 A) Se purificaron células CLL, NLC y M210B4 y se examinó la expresión de CD84. CD84 y ARNm de actina se analizaron por RT-PCR; (Fig. 10B) Los histogramas muestran la expresión de CD84 (línea negra) o la tinción con Ab secundario solo (línea gris) en células de CLL, NLC y M210B4.

- Las figuras 11A-G demuestran que el CD84 expresado en las células del estroma regula la supervivencia de las células de CLL. (Figuras 11A-C) se cultivaron $1,6 \times 10^6$ células de CLL con 1×10^5 M210B4, en presencia o ausencia del hibridoma anti-CD84 B4 (5 µg/ml), o un anticuerpo de referencia. Después de 24 h, se determinó la muerte celular de CLL con tinción con Anexina 7AAD. Se presentan gráficos representativos de 3 experimentos independientes; (figuras 11D-G) ARNsi (ON-TARGETplus SMARTpool, Human CD84 (NM_003874), Dharmacon) para CD84 o un ARNsi aleatorizado de referencia se transfectó en $0,625 \times 10^5$ células M210B4. 18 h después se añadieron al cultivo 1×10^6 células de LLC. 48 h después, se recogieron las células de CLL. Se muestran gráficos de puntos representativos. El gráfico resume 9 experimentos independientes que muestran células CLL vivas relativas (promedio + error típico). *P = 0,04, **P = $3,1 \times 10^{-10}$.
- 10 Las figuras 12A-D demuestran que el bloqueo de CD84 en el estroma con los anticuerpos B1 y B4 reduce la supervivencia de las células de CLL. Se incubaron $0,625 \times 10^5$ células M210B4 con los anticuerpos B1 o B4 o un anticuerpo de referencia (IgG2a). Después de 1 h, los anticuerpos se lavaron y se añadieron 1×10^6 células de CLL. 48 h después, se midió la supervivencia celular mediante tinción con anexina-7AAD. El gráfico resume 3 experimentos independientes, que muestran el número de veces de cambio en las células de CLL vivas en comparación con las células de CLL incubadas con un estroma tratado con anticuerpos de control de isotipo.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a anticuerpos anti CD84, a las composiciones que comprenden los mismos y usos de los mismos.

- 20 Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o llevada a cabo de varias maneras.

- La leucemia linfocítica crónica (CLL) se caracteriza por la acumulación de linfocitos B CD5+ en la sangre periférica, los órganos linfoides y la médula ósea. La principal característica de la enfermedad es la acumulación de células malignas debido a la disminución de la apoptosis. CD84 pertenece a la familia de moléculas activadoras de linfocitos de señalización de inmunorreceptores, y tiene una función desconocida en las células de la CLL. Los presentes inventores han demostrado previamente que la expresión de CD84 se eleva significativamente desde las primeras fases de la enfermedad y está regulada por el factor inhibidor de la migración de macrófagos y su receptor, CD74. La activación de CD84 de la superficie celular inicia una cascada de señalización que mejora la supervivencia de las células de CLL. Tanto la modulación por disminución de la expresión de CD84 como su bloqueo inmunomediado provocan la muerte celular *in vitro* e *in vivo*. Además, el análisis de muestras procedentes de un estudio clínico en curso, en el que se trataron pacientes humanos con anti-CD74 humanizado (milatuzumab), muestra una disminución en las concentraciones de ARN mensajero de CD84 y proteína en células tratadas con milatuzumab. Esta disminución se correlacionó con la reducción de la expresión de Bcl-2 y Mcl-1. Por lo tanto, la sobreexpresión de CD84 en la CLL es un importante mecanismo de supervivencia que parece ser un fenómeno inicial en la patogenia de la enfermedad (Binsky-Ehrenreich *et al.* E. Pub. 25 de febrero de 2013, *Oncogene*, WO2010/035259). Estos resultados sugieren nuevas estrategias terapéuticas basadas en el bloqueo de esta vía de supervivencia dependiente de CD84.

- 40 Los presentes inventores se han dado cuenta ahora de que las interacciones homofílicas entre CD84 expresadas en linfocitos B-CLL y células estromales inducen una señal de supervivencia en las células cancerosas y retienen independientemente las células en el entorno estromal de la médula ósea (véanse las figuras 5A-B). Los presentes inventores han descubierto además que CD84 se expresa en varios tipos de células de linfoma (figura 7B y figura 10 A), así como en diferentes tipos de células estromales. Esto sugiere que CD84 podría estar involucrado en la interacción célula-célula entre las células de la CLL y su microentorno (véase la figura 10 A).

- 45 Por lo tanto, mientras se analizan nuevos anticuerpos que bloquean la vía de supervivencia dependiente de CD84 de la CLL y producen movilización de las células de CLL desde la médula ósea, los presentes inventores han identificado nuevos anticuerpos que provocan apoptosis de las células de CLL y protegen contra la actividad antiapoptótica y la actividad adhesiva de las células estromales cultivadas junto con éstas. Los anticuerpos procedentes de los hibridomas B1 y B4 pudieron regular por disminución la secreción de CCL3 de CLL (Ejemplo 4) y provocar apoptosis de células CLL purificadas y la estirpe celular Ramos de una manera superior en comparación con un anticuerpo anti CD84 aislado previamente descrito en el documento WO2010/035259 (Ejemplo 5). Estos resultados colocan a los anticuerpos presentes como inmunoterapia importante contra la CLL.

Por lo tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar un supuesto fármaco contra una neoplasia maligna de linfocitos B (p. ej., B-CLL), comprendiendo el método:

- 55 (a) tratar un modelo animal que tiene neoplasia de linfocitos B (p. ej., B-CLL) con un agente de prueba; y
- (b) detectar células de neoplasia maligna de linfocitos B (p. ej., B-CLL) en un tejido periférico en comparación con una médula ósea del modelo animal tratado como en (a), en donde un aumento en la proporción en comparación con la proporción antes del tratamiento es indicativo de que el agente de prueba es un supuesto fármaco contra la

neoplasia maligna de linfocitos B (p. ej., B-CLL).

Como se usa en la presente memoria, "un modelo animal que tiene una neoplasia maligna de linfocitos B" se refiere a un mamífero tal como un mamífero no humano que presenta manifestaciones clínicas de una neoplasia maligna de linfocitos B que incluye la B-CLL. El modelo puede ser un modelo espontáneo, un modelo transgénico o un modelo de xenoinjerto en el que se trasplantan células malignas de linfocitos B humanas (por ejemplo, linfocitos B-CLL).

- 5 Kurtova *et al. Blood*. 12 de nov. de 2009; 114 (20): 4441-50 describe varios modelos de ratones transgénicos para B-CLL. Las investigaciones de estos modelos de ratón pusieron de manifiesto que la desregulación de tres vías, la vía Tcl1-Akt, la vía TNF-NF- κ B y la vía antiapoptótica mediada por Bcl2, dan lugar al desarrollo de B-CLL. Si bien la desregulación de TCL1 solo produjo un fenotipo B-CLL en ratones, la sobreexpresión de Bcl2 requirió la señalización de la vía TNF-NF- κ B activada de forma anómala para producir el fenotipo de la enfermedad.

Según una realización específica, el modelo animal se selecciona del grupo que consiste en un modelo de xenoinjerto inducido por trasplante de CLL humana en ratones y el modelo murino Eu-TCL1.

- 15 Como se emplea en la presente memoria, "un agente de prueba" se refiere a una molécula que disminuye la expresión o actividad de CD84. El agente de prueba puede ser una molécula pequeña, un agente asintomático de ácido nucleico (por ejemplo, ARNsi o complementario), un anticuerpo o un péptido (p. ej., una molécula de CD84 soluble que interfiere con las interacciones homofílicas de CD84, como se describe en el documento WO2010/035259).

Según una realización específica, el agente de prueba es un anticuerpo anti CD84.

- 20 La detección de linfocitos B malignos (p. ej., linfocitos B-CLL) se puede hacer usando métodos que son bien conocidos en la técnica y dependen principalmente del modelo utilizado.

Por lo tanto, cuando se utiliza el modelo de xenoinjerto, el seguimiento de la movilización se puede realizar detectando restos humanos en los órganos del ratón. Los ejemplos incluyen, entre otros, el análisis de marcadores de la superficie celular (CD19 humano) o células teñidas previamente (CFSE+).

- 25 Alternativamente o además, los linfocitos B humanos malignos (p. ej., linfocitos B-CLL) pueden teñirse (p. ej., fluorescencia, tinción con radioisótopos) antes del trasplante para facilitar la detección.

Los ejemplos de tejidos periféricos en los que se puede controlar la cantidad de linfocitos B malignos (p. ej., linfocitos B-CLL) incluyen, entre otros, bazo, cavidad peritoneal, sangre periférica, ganglios linfáticos y médula ósea (Durig J. *et al., Cancer Res.* 2007; 67: 8653-8661).

- 30 La proporción de linfocitos B malignos (p. ej., linfocitos B-CLL) en un tejido periférico frente a una médula ósea se compara con un animal de referencia. Un animal de referencia puede ser el mismo animal antes del tratamiento o el mismo animal tratado con un agente de referencia (p. ej., PBS o solución salina) que no afecta la movilización de linfocitos B malignos (p. ej., B-CLL).

- 35 Como se emplea en la presente memoria, un "aumento" se refiere a un aumento estadísticamente significativo. Por lo tanto, el aumento puede ser de al menos 2, 5%, 10%, 20%, 50% o más.

Utilizando la presente metodología se pueden aislar anticuerpos anti CD84.

Por lo tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que se une específicamente a CD84 y

- 40 (i) disminuye la actividad antiapoptótica de células estromales en células de leucemia linfocítica crónica (CLL); y/o (es decir, además o alternativamente)

(ii) produce movilización de células de CLL desde la médula ósea (a los órganos/tejidos periféricos).

Tal como se usa en la presente memoria, "disminuye" se refiere a una reducción estadísticamente significativa. Por lo tanto, la disminución puede ser de al menos 2, 5%, 10%, 20%, 50% o más.

- 45 Como se usa en la presente memoria, "células estromales" se refiere a células adherentes que residen en la médula ósea, también denominadas "células estromales de médula". Los ejemplos de estirpes celulares de estroma medular y estirpes celulares de estroma primario se proporcionan a continuación en la presente memoria y en Kurtova *et al.* anteriormente.

- 50 La reducción de la actividad antiapoptótica de las células del estroma se puede detectar por la reducción de los factores de supervivencia, como IL-6 (en el estroma), IL-8 (en el estroma) y Bcl-2 (B-CL-2, que se reduce tanto en el estroma como en la CLL).

Por lo tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR como se expone en las SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5 y NO: 6 (B4), en donde el anticuerpo se une específicamente a CD84.

- 5 Según una realización específica, el anticuerpo aislado comprende las SEQ ID NO: 4 (CDR1), NO: 5 (CDR2) y NO: 6 (CDR3), (ordenadas secuencialmente de N a C en una cadena ligera de la proteína) y NO: 1 (CDR1), NO: 2 (CDR2) y NO: 3 (CDR3) (ordenadas secuencialmente de N a C en una cadena pesada de la proteína) (Clon B4).

- Alternativamente, se proporciona un anticuerpo aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que comprende regiones determinantes de complementariedad como se expone en las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 y 10 12 (B1), en donde el anticuerpo se une específicamente a CD84.

Según una realización específica, el anticuerpo aislado comprende las SEQ ID NO: 10 (CDR1), NO: 11 (CDR2) y NO: 12 (CDR3), (ordenadas secuencialmente de N a C en una cadena ligera de la proteína) y NO: 7 (CDR1), NO: 8 (CDR2) y NO: 9 (CDR3) (ordenadas secuencialmente de N a C en una cadena pesada de la proteína) (Clon B1).

- 15 Los anticuerpos de la presente invención que tienen las CDR mencionadas anteriormente, se denominan en conjunto "los anticuerpos anti-CD84 de la presente invención".

Como se emplea en la presente memoria, el término "CD84" se refiere a una isoforma expresada del gen CD84. Los ejemplos incluyen, entre otros, Q9UIB8-1, Q9UIB8-2, Q9UIB8-3, Q9UIB8-4, Q9UIB8-5, Q9UIB8-6 y Q9UIB8-7.

- 20 Según una realización específica, el CD84 se refiere a la isoforma C del CD84, una isoforma del CD84 que se asigna con los números de acceso AF054815.1 NP_003865.1 (NM_003874, Q9UIB8-3) o las SEQ ID NO: 13 o NO: 14.

La afinidad general del anticuerpo anti CD84 es preferiblemente mayor que aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M y como tal es estable en condiciones fisiológicas (p. ej., *in vivo*).

Según una realización específica, la afinidad es preferiblemente mayor que (es decir, al menos) aproximadamente, 10^{-8} M o 10^{-9} M, p. ej., $1-50 \times 10^{-9}$ M, $1-100 \times 10^{-9}$ M, $0,5-50 \times 10^{-9}$ M o $0,5-100 \times 10^{-9}$ M.

- 25 Como se usa en la presente memoria, el término "aislado" se refiere a un nivel de pureza tal que la proteína de la invención es la forma predominante (p. ej., más del 50%) en la preparación. En otras palabras, otros anticuerpos que se caracterizan por una baja o nula afinidad con CD84 (que excede los valores anteriores) están presentes en general en la preparación en menos del 50% del total de moléculas de anticuerpo de la preparación. Según una realización específica, el anti CD84 está aislado en la realización fisiológica, p. ej., del cuerpo (p. ej., humano o animal). Según una realización específica, el término aislado también significa aislado de una biblioteca, tal como una biblioteca de presentación de fagos o líneas o bibliotecas de hibridomas.

El anticuerpo de la presente invención se une generalmente a la porción extracelular de CD84 (SEQ ID NO: 15).

Como se emplea en la presente memoria, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo.

- 35 Los determinantes epitópicos generalmente consisten en grupos de moléculas químicamente activos en la superficie, tales como aminoácidos o cadenas laterales de carbohidratos, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

- El término "anticuerpo", tal como se usa en esta invención, incluye moléculas intactas, así como sus fragmentos funcionales, como Fab, $F(ab')_2$ y Fv que son capaces de unirse a macrófagos. Estos fragmentos de anticuerpos 40 funcionales se definen de la manera siguiente: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse por digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos 45 Fab' por molécula de anticuerpo; (3) $(Fab')_2$, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; $F(ab')_2$ es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento modificado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y (5) anticuerpo monocatenario ("SCA"), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera 50 y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocateneria genéticamente fusionada.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como los fragmentos de los mismos, son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

Los fragmentos de anticuerpos según la presente invención se pueden preparar por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* o células de mamífero (p. ej., cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede ser escindido además usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Alternativamente, una escisión enzimática que usa pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos están descritos, por ejemplo, por Goldenberg, patentes de EE.UU. n° 4.036.945 y n° 4.331.647. Véase también Porter, R. R. [*Biochem. J.* 73: 119-126 (1959)]. También se pueden usar otros métodos de escisión de anticuerpos, como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadenas ligeras-pesadas monovalentes, además la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede no ser covalente, como se describe en Inbar *et al.* [*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69: 2659-62 (1972)]. Alternativamente, las cadenas variables pueden unirse mediante un enlace disulfuro intermolecular o pueden reticularse mediante productos químicos tal como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas monocatenarias de unión al antígeno (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que se introduce posteriormente en una célula anfitriona como *E. coli*. Las células anfitrionas biotecnológicas sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos para producir sFv están descritos, por ejemplo, por [Whitlow y Filpula, *Methods* 2: 97-105 (1991); Bird *et al.*, *Science* 242: 423-426 (1988); Pack *et al.*, *Bio/Technology* 11: 1271-77 (1993); y patente de EE.UU n° 4.946.778.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR ("unidades de reconocimiento mínimo") pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry [*Methods*, 2: 106-10 (1991)].

Según una realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de cualquier subtipo, p. ej., IgG, IgM, IgA, etc. Según una realización específica, el anticuerpo es IgG1 o IgG4.

Según una realización específica, el anticuerpo es una IgG2a (p. ej., B4, B1) o IgG1 (p. ej., B1). Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son moléculas híbridas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos forman una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos de importación, que normalmente se toman de un dominio variable de importación. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo las CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos híbridos (Pat. de EE.UU. n° 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los cuales algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluidas las bibliotecas de presentación de fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol.*

Biol., 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991)]. De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden producir mediante la introducción de locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Al enfrentarse, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a lo que se ve en seres humanos en todos los aspectos, incluida la reorganización de genes, el ensamblaje, y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.545.807; n° 5.545.806; n° 5.569.825; n° 5.625.126; n° 5.633.425; n° 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995).

Se apreciará que las secuencias de CDR descritas en la presente memoria puedan implementarse en una configuración de anticuerpos biespecíficos.

Como se emplea en la presente memoria, anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional", se refiere a un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos puntos de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos incluida la fusión de hibridomas. Véase, p. ej., Songsivilai y Lachmann (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321; Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148: 1547-1553. El anticuerpo biespecífico puede unirse a CD84 y a otro objetivo que es de esperar que coopere con CD84 en procesos biológicos, como la apoptosis, o que pueda aumentar la especificidad a los linfocitos B malignos (p. ej., B-CLL). Los ejemplos de dichos objetivos incluyen, entre otros a, CD74, CD19, CD5, receptores de la familia SLAM (como NTB-A; SLAMF7). Alternativa o además, el anticuerpo biespecífico puede unirse a CD84 en un epítipo, que es distintivo del epítipo al que se unen los anticuerpos B1 o B4. Alternativa o además, el anticuerpo biespecífico puede incluir las CDR B1 y B4.

Según una realización específica, el anticuerpo inhibe las interacciones homofílicas de CD84.

Tal como se emplea en la presente memoria, "interacciones homofílicas de CD84" se refiere a la capacidad de CD84 para autoasociarse fuertemente con una Kd en el intervalo submicromolar; la asociación está dirigida por el dominio Ig-V, formando un dímero homofílico ortogonal. Según una realización específica, las interacciones homofílicas son entre el CD84 en la CLL y el CD84 en las células del estroma, así como entre el CD84 en las células de CLL.

Los métodos para determinar las interacciones homofílicas de CD84 incluyen, entre otros, ARNsi de CD84 en el estroma, ratones transgénicos de CD84. Las interacciones homofílicas de CD84 se demostraron previamente en Yan *et al.*, *PNAS* 2007.

Se ha sugerido anteriormente que las células de CLL pueden manipular activamente su microentorno [Binder M. *et al.*, *PLoS One*. 2012. 5 (12): e15992, Neil E Kay *et al.*, *Leuk Res.* julio de 2007; 31 (7): 899-906]. Específicamente, se ha demostrado que las células de CLL provocan efectos antiapoptóticos en sus equivalentes estromales en el cultivo. La interacción de células del estroma-CLL induce la expresión y secreción de citocinas específicas (es decir, IL-6, IL-8) del estroma e induce la expresión de moléculas de adhesión específicas como ICAM-1, mientras que la expresión de otras moléculas de adhesión permanece inalterada (es decir, VCAM-1) [Plander M. *et al.*, *Annals of Hematology*. 2011. 90 (12): 1381-90].

Según una alternativa o una realización adicional, el anticuerpo es capaz de reducir la actividad antiapoptótica de las células estromales en las células de leucemia linfocítica crónica (CLL), así como la de las células de CLL en las células estromales.

Como se muestra en la sección de ejemplos que sigue, las células de CLL cultivadas con células estromales en presencia o ausencia de un anticuerpo CD84 de algunas realizaciones de la invención mostraron una reducción del gen Bcl-2 antiapoptótico (figura 2A) y se repite en la citocina IL-6 (figura 2B). La incubación con células CLL elevó las concentraciones de ARNm de Bcl-2 e IL-6 en células estromales, mientras que no se observaron cambios en el mensaje de VCAM-1.

Curiosamente, el bloqueo de CD84 redujo los niveles del mensaje de Bcl-2 (figura 2A) e IL-6 (figura 2B), mientras que los niveles de VCAM-1 no se vieron afectados por este bloqueo (figura 2C). La identificación de los cambios en la expresión génica (nivel de ARNm) o en la síntesis/secreción de proteínas puede hacerse usando métodos que son bien conocidos en la técnica. La expresión de ARNm puede cuantificarse mediante RT-PCR o PCR cuantitativa en tiempo real, la secreción de citocinas se puede detectar utilizando ELISA en medio de cultivo.

Como se emplea en la presente memoria, el término "inhibir" o "disminuir" se refiere a una disminución estadísticamente significativa en la expresión génica (p. ej., Bcl-2) o la secreción de proteínas (p. ej., IL-6, IL-8 o CCL3) en al menos el 10%. 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80% o más.

Debido a su capacidad para unirse a CD84 e inhibir su función (en al menos uno de los modos descritos anteriormente), el anticuerpo anti CD84 de algunas realizaciones de la invención también se conoce como un

"anticuerpo bloqueador" o un "anticuerpo neutralizante" y como tal puede utilizarse en aplicaciones terapéuticas.

- Por lo tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un método para inducir apoptosis en linfocitos B de un sujeto que tiene una neoplasia maligna de linfocitos B (p. ej., B-CLL), comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD84 como se describe en la presente memoria, induciendo así la apoptosis en los linfocitos B del sujeto.

Por consiguiente, las presentes instrucciones también contemplan un método para inducir apoptosis en células de CLL. El método comprende poner en contacto las células de CLL con el anticuerpo de la presente invención (descrito anteriormente), induciendo así la apoptosis de las células de CLL.

Según una realización de este aspecto de la invención, el método se efectúa *in vivo*.

- 10 Según una realización de este aspecto de la invención, el método se efectúa *ex vivo*.

Según una realización de este aspecto de la invención, el método se efectúa *in vitro*.

Como se emplea en la presente memoria, "inducir apoptosis" se refiere a aumentar el nivel de apoptosis en las células tratadas en al menos 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70% o incluso más.

- 15 Los métodos para determinar la apoptosis incluyen, entre otros, tinción con Anexina y tinción con rojo mágico. Las características específicas de dichos métodos se describen en la sección de ejemplos que sigue.

Según otro aspecto, se proporciona un método para tratar B-CLL en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD84 como se describe en la presente memoria, tratando de este modo la B-CLL.

- 20 Aún según otro aspecto, se proporciona el uso del anticuerpo anti-CD84 como se describe en la presente memoria en la fabricación de un medicamento identificado para el tratamiento de una enfermedad maligna de linfocitos B.

Como se usa en la presente memoria, la terminología "sujeto" o "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, por ejemplo, un sujeto humano, hombre o mujer de cualquier edad, a quien se le haya diagnosticado una enfermedad maligna de linfocitos B.

- 25 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "neoplasia maligna de linfocitos B" se refiere a una neoplasia maligna de tejidos hematopoyéticos o linfoides que involucra linfocitos B de cualquier subtipo o fase de diferenciación (p. ej., linfocitos pre-B prematuros, linfocitos pre-B, linfocitos B maduros, células plasmáticas).

Según una realización, la neoplasia maligna de linfocitos B comprende un linfoma, una leucemia o un mieloma.

- 30 Dichas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (BCLL)/leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, leucemia mielocítica crónica (LMC), un linfoma de linfocitos B de la zona marginal extraganglionar - linfoma de tejido linfocítico asociado a la mucosa, un linfoma folicular, un linfoma de células del manto, un linfoma de linfocitos B de la zona marginal ganglionar, un linfoma de Burkitt, una leucemia de tricoleucocitos, un linfoma primario del sistema nervioso central, un linfoma esplénico de las linfocitos B de la zona marginal, un linfoma linfoplasmocítico, un linfoma mediastínico primario de las linfocitos B, mieloma múltiple, 35 leucemia linfocítica aguda (también conocida como leucemia linfoblástica aguda o ALL), leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, leucemia de células plasmáticas, leucemia de células pre-B (p. ej., LLA pre-B), LLA de células pre-B prematura (p. ej., LLA pre-B prematura) o leucemia linfoblastoide aguda pre-B.

Según una realización, la neoplasia maligna de linfocitos B es B-CLL.

- 40 Como se emplea en la presente memoria, el término "B-CLL" o "CLL" se refiere a una proliferación neoplásica anormal de linfocitos B. Se considera que la CLL es idéntica a una enfermedad llamada linfoma linfocítico pequeño (SLL), un tipo de linfoma no hodgkiniano que se presenta principalmente en los ganglios linfáticos. La Organización Mundial de la Salud considera que la CLL y el SLL presentan diferentes fases de la misma enfermedad [Chiorazzi N., Rai K. R., Ferrarini M. (2005). "Chronic lymphocytic leukemia". *N. Engl. J. Med.* 352 (8): 804-15].

- 45 Como se emplea en la presente memoria, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o invertir la evolución de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar al sujeto de por sí, o en una composición farmacéutica donde se mezclan con vehículos o excipientes adecuados.

- 50 Como se emplea en la presente memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la

administración de un compuesto a un organismo.

En la presente memoria, la expresión "principio activo" se refiere al agente responsable del efecto biológico (es decir, disminución en la actividad o expresión de CD84).

- 5 En lo sucesivo, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse indistintamente se refieren a un vehículo o diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante se incluye en estas expresiones.

- 10 En la presente memoria, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte agregada a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un principio activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para la formulación y administración de medicamentos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, última edición.

- 15 Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como intratecales, intraventriculares directos, intracardíacos, p. ej., en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, inyecciones intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

- 20 Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica de manera local en lugar de general, por ejemplo, por inyección de la composición farmacéutica directamente en la región del tejido de un paciente.

El término "tejido" se refiere a parte de un organismo que consiste en un agregado de células que tienen una estructura similar y/o una función común. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tejido cerebral, retina, tejido cutáneo, tejido hepático, tejido pancreático, hueso, cartilago, tejido conjuntivo, tejido sanguíneo, tejido muscular, tejido cardíaco, tejido cerebral, tejido vascular, tejido renal, tejido pulmonar, tejido gonadal, tejido hematopoyético.

- 25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar mediante procesos bien conocidos en la técnica, p. ej., por medio de procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, oclusión o liofilización.

- 30 Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el tratamiento de los principios activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

- 35 Para inyectables, los principios activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en amortiguadores fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o amortiguador salino fisiológico. Para la administración a través de las mucosas, los penetrantes apropiados para la barrera a permear se usan en la formulación. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

- 40 Para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para ingestión oral por parte de un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden preparar usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y tratando la mezcla de gránulos, después de agregar sustancias auxiliares adecuadas si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluidos lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparados de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil-celulosa, 45 hidroxipropilmetil-celulosa, carbometil-celulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes disgregadores, como polivinilpirrolidona reticulada, agar-agar o ácido alginico o una de sus sales, como alginato de sodio.

- 50 Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados. Con este propósito, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

- 55 Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como

almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los principios activos pueden disolverse o ponerse en suspensión en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

- 5 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

Para administración por inhalación nasal, los principios activos para su uso según la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de atomizador en aerosol desde un envase o un nebulizador presurizado con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis individual se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para uso en un dispensador pueden formularse con una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, como lactosa o almidón.

- 10

La composición farmacéutica descrita en la presente memoria puede formularse para administración parenteral, p. ej., mediante inyección intravenosa rápida o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica individual, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis con opcionalmente, un conservante agregado. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

- 15

- 20 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los principios activos pueden prepararse como suspensiones inyectables apropiadas a base de agua o aceite. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

- 25

Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para la disolución con un vehículo adecuado, p. ej., una solución a base de agua esterilizada y exenta de pirógenos, antes de su uso.

- 30 La composición farmacéutica de la presente invención también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, p. ej., bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de principios activos eficaces para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (p. ej., una neoplasia maligna de linfocitos B incluida la B-CLL) o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado. En una realización específica, la cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para inducir apoptosis de linfocitos B de una neoplasia maligna de linfocitos B (p. ej., inducir la apoptosis de linfocitos B-CLL).

- 35

- 40 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir una concentración o valor deseado. Dicha información puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

- 45

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en la presente memoria pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos normalizados *in vitro*, en cultivos celulares o en animales experimentales.

Un modelo animal B-CLL tal como el híbrido de ratón NOD-SCID como se describió anteriormente [Shimoni A., Marcus H., Canaan A., *et al.* A model for human B-chronic lymphocytic leukemia in human/mouse radiation chimera: evidence for tumor-mediated suppression of antibody production in low-stage disease. *Blood*. 1997; 89: 2210-2218], se puede usar para determinar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la presente invención *in vivo*. Las células mononucleares de sangre periférica humana de pacientes con B-CLL en diferentes fases de la enfermedad se transfieren mediante inyección intraperitoneal. Este sistema apoya la supervivencia a largo plazo de las células tumorales humanas. Los ratones híbridos se tratan con los anticuerpos de la presente invención durante diferentes períodos de tiempo, y a continuación se evalúa el efecto sobre el injerto de las células y la supervivencia.

- 50
- 55

Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para

formular un intervalo de dosis para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar según la forma galénica empleada y la vía de administración utilizada. Cada médico puede elegir la formulación exacta, la vía de administración y la dosis en función del estado del paciente. (Véase, p. ej., Fingl, *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1, pág. 1).

- 5 La cantidad de dosis y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar (tejido) los niveles del principio activo son suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración mínima eficaz, MEC). La MEC variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosis necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Se pueden usar ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.
- 10 Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la administración puede ser de una sola o de varias administraciones, con un ciclo de tratamiento que puede durar desde varios días hasta varias semanas o hasta que se realice la cura o se consiga la disminución de la enfermedad.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto a tratar, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico, etc.

- 15 Las composiciones de la presente invención pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un equipo aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas galénicas unitarias que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede acomodarse mediante un aviso relacionado con el
- 20 recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser del etiquetado aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para medicamentos con receta o de un prospecto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden un preparado de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible
- 25 también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como además se detalló anteriormente.

Para mejorar la eficacia terapéutica, los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse además junto con el tratamiento convencional para una neoplasia maligna de linfocitos B (p. ej., para B-CLL), como quimioterapia, radioterapia, bioterapia, p. ej., inmunoterapia o trasplante de médula ósea.

- 30 La siguiente es una lista no limitativa de ejemplos de tratamientos convencionales para B-CLL.

Análogos de purina - fludarabina o clorambucilo se usan generalmente en este tipo de tratamientos. Anticuerpos monoclonales - Anticuerpos monoclonales tales como alemtuzumab (dirigido contra CD52) y rituximab (dirigido contra CD20) se usan generalmente en este tipo de tratamientos.

- 35 Poliquimioterapia - Las opciones de la poliquimioterapia generalmente se usan en la CLL recién diagnosticada y en recaída. Recientemente, los ensayos aleatorios han demostrado que las combinaciones de análogos de purina (fludarabina) con agentes alquilantes (ciclofosfamida) producen mayores tasas de respuesta y una mayor supervivencia sin progresión que los agentes por separado: p. ej., FC (fludarabina con ciclofosfamida); FR (fludarabina con rituximab); FCR (fludarabina, ciclofosfamida y rituximab); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona).
- 40 Trasplante alogénico de médula ósea (células madre) - Rara vez utilizado como tratamiento de primera línea para una enfermedad maligna de linfocitos B (p. ej., CLL) debido a su riesgo. Existe un interés creciente en el uso del trasplante alogénico de células madre de intensidad reducida, que ofrece la posibilidad de curación para pacientes seleccionados con un donante adecuado.

- 45 La capacidad de los anticuerpos de la presente invención para unirse a linfocitos B-CLL que expresan CD84 impulsa su uso en aplicaciones de diagnóstico.

Por lo tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un método para diagnosticar una neoplasia maligna de linfocitos B (p. ej., B-CLL) en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en condiciones que permitan la formación de inmunocomplejos entre la isoforma C de CD84 (SEQ ID NO: 14) y dicho anticuerpo; y
- 50

(b) determinar un nivel de dichos inmunocomplejos en dicha muestra biológica, en donde un aumento en el nivel de dichos inmunocomplejos más allá de un umbral predeterminado con respecto a un nivel de dichos inmunocomplejos en una muestra biológica de un individuo sano es indicativo de la neoplasia maligna de linfocitos B (p. ej., B-CLL).

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "diagnosis" o "diagnóstico" se refiere a la clasificación de

una patología (p. ej., cáncer, p. ej., cáncer de linfocitos B, como leucemia, p. ej., leucemia linfocítica crónica (CLL), p. ej., B-CLL).

- Según este aspecto de la invención, el término "sujeto" o "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, p. ej., un sujeto humano que tiene una revisión de rutina o un examen de la patología, así como a un sujeto que está en situación de riesgo de tener la patología tal como debido a antecedentes familiares, factores ambientales y/o un sujeto que presenta signos clínicos sospechosos de la patología. Algunos signos clínicos de una neoplasia maligna de linfocitos B, incluida la B-CLL, incluyen, entre otros, la predisposición a infecciones repetidas, como neumonía, herpes simple labial y herpes zóster; ganglios linfáticos agrandados; saciedad precoz y/o molestias abdominales que pueden estar relacionadas con un bazo agrandado; hemorragia mucocutánea y/o petequias que pueden deberse a trombocitopenia; cansancio y fatiga debido a anemia; fiebres, escalofríos y sudores nocturnos y pérdida de peso; anemia hemolítica autoinmunitaria.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "isoforma C de CD84" se refiere a la isoforma de CD84 que se asigna con los números de acceso AF054815.1 NP_003865.1 (NM 003874, Q9UIB8-3). SEQ ID NO: 13 y nº 14.

- Los ejemplos de "muestras biológicas" incluyen, entre otros, sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, líquidos linfáticos y diversas secreciones externas de vías respiratorias, intestinos y aparato genitourinario, lágrimas, saliva, leche así como leucocitos, células, tejidos, cultivo celular, p. ej., cultivo primario. Según una realización específica, la muestra biológica comprende linfocitos B.

Los linfocitos B malignos (p. ej., linfocitos B-CLL) pueden obtenerse de la sangre, la médula ósea, el bazo y/o los ganglios linfáticos.

- La concentración de isoforma C de CD84 puede determinarse en proteínas (nivel de expresión y/o actividad) o en ARNm (p. ej., RT-PCR, PCR en tiempo real, etc.).

La siguiente es una lista no restrictiva de ejemplos de métodos para determinar una concentración de CD84C utilizando el anticuerpo de la presente invención.

- Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA):** Este método implica una reacción entre una enzima y un sustrato. Una muestra biológica que comprende CD84C se coloca en un placa con micropocillos. El anticuerpo específico de CD84 acoplado a una enzima se aplica y se deja que se una al sustrato. La presencia del anticuerpo se detecta y cuantifica a continuación por una reacción colorimétrica que emplea la enzima acoplada al anticuerpo. Las enzimas normalmente empleadas en este método incluyen la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina. Si está bien calibrado y dentro del intervalo lineal de respuesta, la cantidad de sustrato presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producida. Generalmente se emplea un patrón de sustrato para mejorar la precisión cuantitativa.

- Inmunotransferencia Western:** Este método implica la separación de un sustrato de otra proteína por medio de un gel de acrilamida seguido de la transferencia del sustrato a una membrana (p. ej., nailon o PVDF). La presencia del sustrato se detecta a continuación mediante anticuerpos específicos del sustrato (se usa el anticuerpo anti-CD84 descrito en la presente memoria), que a su vez se detectan mediante reactivos de unión a anticuerpos. Los reactivos de unión a anticuerpos pueden ser, por ejemplo, proteína A u otros anticuerpos. Los reactivos de unión a anticuerpos pueden estar marcados radiactivamente o ligados a enzimas como se describe anteriormente en la presente memoria. La detección puede ser por autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este método permite tanto la cuantificación de una cantidad de sustrato como la determinación de su identidad por una posición relativa en la membrana lo que es indicativo de una distancia de migración en el gel de acrilamida durante la electroforesis.

- Radioinmunoanálisis (RIA):** En una versión, este método implica la precipitación de la proteína deseada (es decir, el sustrato) con un anticuerpo específico de CD84, como se describe en la presente memoria, y la proteína de unión del anticuerpo radiomarcado (p. ej., la proteína A marcada con I^{125}) inmovilizado sobre un vehículo precipitable tal como perlas de agarosa. El número de recuentos en el sedimento precipitado es proporcional a la cantidad de sustrato.

- En una versión alternativa del RIA, se emplean un sustrato marcado y una proteína de unión a anticuerpos sin marcar. Una muestra que contiene una cantidad desconocida de sustrato se agrega en cantidades variables. La disminución en los recuentos precipitados del sustrato marcado es proporcional a la cantidad de sustrato en la muestra agregada.

- Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS):** Este método implica la detección de un sustrato *in situ* en células mediante anticuerpos específicos del sustrato, es decir, el anticuerpo CD84. Los anticuerpos específicos del sustrato están unidos a fluoróforos. La detección se realiza mediante una máquina de clasificación de células que lee la longitud de onda de la luz emitida desde cada célula a medida que pasa a través de un haz de luz. Este método puede emplear dos o más anticuerpos simultáneamente.

Análisis inmunohistoquímico: Este método implica la detección de un sustrato *in situ* en células fijas por anticuerpos

específicos de sustrato, es decir, un anticuerpo anti-CD84 como se describe en la presente memoria. Los anticuerpos específicos del sustrato pueden estar ligados a enzimas o ligados a fluoróforos. La detección se realiza por microscopia y evaluación subjetiva o automática. Si se emplean anticuerpos ligados a enzimas, puede requerirse una reacción colorimétrica. Se apreciará que la inmunohistoquímica a menudo vaya seguida de una tinción por contraste de los núcleos celulares utilizando, por ejemplo, tinción con hematoxilina o Giemsa.

Como se mencionó, un aumento en la concentración de CD84C más allá de un umbral predeterminado con respecto a la concentración del mismo en una muestra similar de un individuo sano es indicativo de la enfermedad (p. ej., B-CLL).

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "muestra biológica de un individuo sano" se refiere a una muestra de referencia no afectada tomada de un sujeto sano (se sabe que no tiene una neoplasia maligna de linfocitos B tal como B-CLL) o del mismo sujeto antes de la aparición de la neoplasia maligna de los linfocitos B, p. ej., B-CLL (es decir, sano). Dado que las características biológicas dependen, entre otras cosas, de la especie y la edad, es preferible que la saliva de referencia provenga de un sujeto de la misma especie y edad. Alternativamente, los datos de referencia pueden tomarse de bases de datos y bibliografía. Se apreciará que la muestra de referencia también puede tomarse del sujeto enfermo en un momento determinado, para analizar la evolución (es decir, el seguimiento) de la enfermedad.

El término "aumento" según una realización específica debe ser estadísticamente significativo.

Una vez se hace el diagnóstico, el sujeto puede ser informado de la enfermedad, es decir, de su presencia o ausencia y posibles tratamientos para la neoplasia maligna de linfocitos B, p. ej., B-CLL.

Para mejorar la sensibilidad del ensayo, el método puede comprender además corroborar el diagnóstico usando un ensayo de diagnóstico seleccionado de la expresión del marcador de superficie distintivo de dicha isoforma c de CD84, análisis de cariotipo y mutaciones de la estirpe germinativa.

A continuación se incluye una lista no restrictiva de dichos ensayos/marcadores que pueden utilizarse para corroborar el diagnóstico de una neoplasia maligna de linfocitos B como la B-CLL.

Marcadores de la superficie celular - Los linfocitos B-CLL normalmente presentan antígenos de la superficie de los linfocitos B, como lo demuestran los anticuerpos monoclonales CD19, CD20, CD21 y CD23. Además, expresan CD5, que se suele encontrar más en los linfocitos T. Debido a que los linfocitos B CD5⁺ normales están presentes en la zona del manto (MZ) de los folículos linfoides, la B-CLL es muy probablemente una neoplasia maligna de una subpoblación basada en MZ de células autorreactivas anérgicas dedicadas a la producción de autoanticuerpos naturales polirreactivos. Las linfocitos B-CLL expresan niveles extremadamente bajos de inmunoglobulina de la membrana superficial, con mayor frecuencia inmunoglobulina M (IgM) o IgM/IgD e IgD. Además, también expresan niveles extremadamente bajos de una sola cadena ligera de inmunoglobulina (kappa o lambda).

Análisis genético - Se observa un cariotipo anormal en la mayoría de los pacientes con CLL. La anomalía más frecuente es la eliminación de 13q, que se produce en más del 50% de los pacientes. Los individuos que muestran anomalías en 13q14 tienen una enfermedad relativamente benigna que generalmente se manifiesta como una linfocitosis aislada estable o de evolución lenta.

La presencia de la trisomía 12, que se observa en el 15% de los pacientes, se asocia a la morfología atípica y la enfermedad progresiva. La eliminación en el brazo corto del cromosoma 17 se ha asociado con la evolución rápida, remisión corta y disminución de la supervivencia general en la CLL. Las eliminaciones de 17p13 están asociadas a la pérdida de la función del gen *p53* supresor de tumores. Las eliminaciones de las bandas 11q22-q23, observadas en el 19% de los pacientes, se asocian a una afectación extensa de los ganglios linfáticos, una enfermedad agresiva y una supervivencia más corta.

Las técnicas más sensibles han demostrado anomalías del cromosoma 12. Cuarenta a 50% de los pacientes no muestran anomalías cromosómicas en estudios citogenéticos convencionales. Sin embargo, el 80% de los pacientes tendrán anomalías detectables por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Aproximadamente el 2-5% de los pacientes con B-CLL presentan un fenotipo de linfocitos T.

Las investigaciones también han identificado una serie de características genéticas y marcadores de alto riesgo que incluyen la cadena pesada variable de inmunoglobulina de la estirpe germinativa (IgV_H), el uso del gen V3-21 de IgV_H, la expresión de CD38 aumentada, la expresión de Zap70 aumentada, concentraciones elevadas de beta-2-microglobulina en suero, actividad aumentada de timidina quinasa sérica, tiempo corto de duplicación de linfocitos (<6 meses) y aumento de las concentraciones séricas de CD23 soluble. Estas características se han relacionado con la evolución rápida, la remisión corta, la resistencia al tratamiento y la supervivencia general reducida en pacientes con B-CLL.

Mutaciones en la estirpe germinativa - Se ha demostrado que la estirpe germinativa IgV_H indica un pronóstico insuficiente. Los estudios han demostrado que estos pacientes también tienen una evolución más temprana de B-CLL después del tratamiento con quimioterapia. El uso de determinados genes de IgV_H, V3-21, también se ha

relacionado con un pronóstico insuficiente independientemente del estado mutacional de IgV_H.

Para cualquiera de los propósitos clínicos anteriores (diagnóstico o terapéutico), el anticuerpo anti-CD84 de la presente invención puede unirse (conjugarse o acoplarse) a un agente farmacéutico.

Por consiguiente, el anticuerpo puede unirse a un agente farmacéutico.

- 5 Como se emplea en la presente memoria, un agente farmacéutico puede ser un fármaco (usado en el tratamiento) o un resto detectable.

Varios tipos de restos detectables o indicadores pueden conjugarse con las proteínas de la invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, un isótopo radioactivo (como ¹²⁵I yodo), un producto químico fosforescente, un producto químico quimioluminiscente, un producto químico fluorescente (fluoróforo), una enzima, un polipéptido fluorescente, una etiqueta de afinidad, y moléculas (agentes de contraste) detectables por tomografía por emisión de positrones (PET) o resonancia magnética nuclear (MRI).

- 10 Los ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), Cy-chrome, rodamina, proteína verde fluorescente (GFP), proteína azul fluorescente (BFP), rojo Texas, PE-Cy5 y similares. Para obtener orientación adicional con respecto a la selección de fluoróforos, métodos de acoplamiento de fluoróforos con varios tipos de moléculas véase Richard P. Haugland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Sones and Research Chemicals 1992-1994", 5ª ed., Molecular Probes, Inc. (1994) ; Pat. de EE.UU. nº 6.037.137 de Oncoimmunin Inc.; Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press Nueva York, N.Y. (1995); Kay M. *et al.*, 1995. *Biochemistry* 34: 293; Stubbs *et al.*, 1996. *Biochemistry* 35: 937; Gakamsky D. *et al.*, "Evaluating Receptor Stoichiometry by Fluorescence Resonance Energy Transfer", en "Receptors: A Practical Approach", 2ª ed., Stanford C. y Horton R. (eds.), Oxford University Press, Reino Unido (2001); Pat. de EE.UU. nº 6.350.466 de Targesome, Inc.]. Los métodos de detección por fluorescencia que pueden usarse para detectar el anticuerpo cuando se conjugan con un resto fluorescente detectable incluyen, por ejemplo, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), microscopia confocal de inmunofluorescencia, hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

- 25 Se pueden acoplar numerosos tipos de enzimas al anticuerpo de la invención [p. ej., peroxidasa de rábano picante (HPR), beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina (AP)] y la detección de anticuerpos conjugados con enzimas se puede realizar usando ELISA (p. ej., en solución), ensayo inmunohistoquímico ligado a enzimas (p. ej., en un tejido fijo), ensayo de quimioluminiscencia ligado a enzimas (p. ej., en una mezcla de proteínas separadas por electroforesis) u otros métodos conocidos en la técnica [véase, p. ej., Khatkhatay M. I. y Desai M., 1999. *J. Immunoassay* 20:151-83; Wisdom G. B., 1994. *Methods Mol. Biol.* 32: 433-40; Ishikawa E. *et al.*, 1983. *J. Immunoassay* 4: 209-327; Oellerich M., 1980. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18: 197-208; Schuurs A. H. y van Weemen B. K., 1980. *J. Immunoassay* 1: 229-49].

- 35 Una etiqueta de afinidad (o un miembro de un par de unión) puede ser un antígeno identificable por un anticuerpo correspondiente [p. ej., digoxigenina (DIG) que se identifica por un anticuerpo anti-DIG] o una molécula que tiene una alta afinidad hacia la etiqueta [p. ej., estreptavidina y biotina]. El anticuerpo o la molécula que se une a la etiqueta de afinidad se pueden marcar por fluorescencia o conjugar con la enzima como se describió anteriormente.

- Se pueden emplear diversos métodos, ampliamente puestos en práctica en la técnica, para acoplar una molécula de estreptavidina o biotina al anticuerpo de la invención. Por ejemplo, se puede acoplar una molécula de biotina al anticuerpo de la invención mediante la secuencia de reconocimiento de una proteína ligasa de biotina (p. ej., BirA) como se describe en el apartado Ejemplos que sigue y en Denkerberg, G. *et al.*, 2000. *Eur. J. Immunol.* 30: 3522-3532. Alternativamente, una molécula de estreptavidina puede acoplarse a un fragmento de anticuerpo, como un Fv monocatenario, esencialmente como se describe en Cloutier S. M. *et al.*, 2000. *Molecular Immunology* 37: 1067-1077; Dubel S. *et al.*, 1995. *J. Immunol. Methods* 178: 201; Huston J. S. *et al.*, 1991. *Methods in Enzymology* 203: 46; Kipriyanov S. M. *et al.*, 1995. *Hum. Antibodies Hybridomas* 6:93; Kipriyanov S. M. *et al.*, 1996. *Protein Engineering* 9: 203; Pearce L. A. *et al.*, 1997. *Biochem. Molec. Biol. Intl.* 42: 1179-1188).

Los restos funcionales, tales como fluoróforos, conjugados con estreptavidina están disponibles en el mercado en esencialmente todos los proveedores principales de reactivos de citometría de flujo por inmunofluorescencia (por ejemplo, Pharmingen o Becton-Dickinson).

- 50 Como se emplea en la presente memoria, "fármaco" se refiere a un principio terapéuticamente activo como una molécula pequeña (p. ej., quimioterapia), una toxina, una proteína, un lípido, un carbohidrato o una de sus combinaciones.

Alternativamente o además, las proteínas pueden acoplarse (o conjugarse) a restos no proteicos que aumentan su biodisponibilidad y vida media en la circulación.

- 55 La expresión "resto no proteico", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula que no incluye aminoácidos unidos a péptidos que están acoplados a la proteína descrita anteriormente. Los restos no proteicos y preferiblemente atóxicos ejemplares que se pueden usar según las presentes instrucciones incluyen, pero no se

limitan a, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), poli(anhídrido comaleico y estireno) (SMA) y copolímero de de éter divinílico y anhídrido maleico (DIVEMA).

Dicha molécula es muy estable (resistente a la actividad proteolítica *in vivo* probablemente debido al impedimento estérico conferido por el resto no proteico) y puede producirse utilizando métodos comunes de síntesis en fase sólida que son económicos y muy eficientes, como se describe más adelante en la presente memoria. Sin embargo, se apreciará que todavía se pueden usar técnicas biotecnológicas, por lo que el producto peptídico biotecnológico se somete a modificación *in vitro* (p. ej., PEGilación como se describe además a continuación).

Por lo tanto, dichos restos atóxicos no proteicos también pueden acoplarse a las proteínas mencionadas anteriormente para favorecer la estabilidad y posiblemente la solubilidad de las moléculas.

- 10 La bioconjugación de dicho resto no proteico (como la PEGilación) puede conferir a las proteínas la secuencia de aminoácidos con estabilidad (p. ej., contra las actividades de la proteasa) y/o solubilidad (p. ej., dentro de un fluido biológico, como la sangre, el fluido digestivo), a la vez que conserva su actividad biológica y prolonga su vida media.

- 15 La bioconjugación presenta ventajas particularmente en casos de proteínas terapéuticas que presentan una vida media corta y una rápida depuración de la sangre. El aumento de las vidas medias de las proteínas bioconjugadas en el plasma se debe al aumento en el tamaño de los conjugados de proteínas (lo que limita su filtración glomerular) y la disminución de la proteólisis debido al impedimento estérico del polímero. En general, cuantas más cadenas de polímeros se unen por péptido, mayor es la extensión de la vida media. Sin embargo, se toman medidas para no reducir la actividad específica de la proteína de la presente invención (p. ej., la unión a CD84).

- 20 La bioconjugación de la proteína con PEG (es decir, la PEGilación) puede efectuarse utilizando derivados de PEG como los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) de ácidos carboxílicos de PEG, monometoxi-PEG₂-NHS, éster succinimidílico de PEG carboximetilado (SCM-PEG), derivados de carbonato de benzotriazol de PEG, éteres glicídicos de PEG, carbonatos de pEG-nitrofenilo (PEG-NPC, tal como metoxi PEG-NPC), PEG aldehídos, disulfuro de PEG-ortopiridilo, PEG activados con carbonildimidazol, PEG-tiol, PEG-maleimida. Dichos derivados de PEG están disponibles en el mercado en varios pesos moleculares [Véase, p. ej., Catalog, Polyethylene Glycol and
25 Derivatives, 2000 (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama)]. Si se desea, muchos de los derivados anteriores están disponibles en una forma monometoxiPEG (mPEG) monofuncional. En general, el PEG agregado a la secuencia de aminoácidos de CCL1 de la presente invención debe variar desde un peso molecular (PM) de varios cientos de Dalton a aproximadamente 100 kDa (p. ej., entre 3 y 30 kDa). Se puede usar PEG de PM mayor, pero puede dar como resultado alguna pérdida de rendimiento de péptidos PEGilados. También debe observarse la
30 pureza de las moléculas de PEG más grandes, ya que puede ser difícil obtener un PEG de PM más grande de pureza tan grande como la que puede obtenerse para PEG de PM más bajo. Es preferible usar PEG de al menos 85% de pureza, y más preferiblemente de al menos 90% de pureza, de 95% de pureza o mayor. La PEGilación de moléculas se expone más a fondo, por ejemplo, en Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press San Diego, California (1996), en el capítulo 15 y en Zalipsky *et al.*, "Succinimidyl Carbonates of Polyethylene Glycol", en
35 Dunn and Ottenbrite, eds., Drogas poliméricas y sistemas de administración de fármacos, American Chemical Society, Washington, DC (1991). Es preferible usar PEG de al menos 85% de pureza, y más preferiblemente de al menos 90% de pureza, 95% de pureza o mayor. La PEGilación de moléculas se discute más a fondo, por ejemplo, en Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press San Diego, California (1996), en el Capítulo 15 y en Zalipsky *et al.*, "Succinimidyl Carbonates of Polyethylene Glycol", en Dunn and Ottenbrite, eds., Polymeric Drugs and
40 Drug Delivery Systems, American Chemical Society, Washington, D.C. (1991).

- Se pueden emplear diversas químicas de conjugación de PEG activado, tales como PEG-maleimida, PEG-vinilsulfona (VS), PEG-acrilato (AC), disulfuro de PEG-ortopiridilo. Los métodos para preparar moléculas de PEG activadas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, PEG-VS puede prepararse bajo argón haciendo reaccionar una
45 solución de diclorometano (DCM) del PEG-OH con NaH y a continuación con divinilsulfona (relaciones molares: OH 1: NaH 5: divinil sulfona 50, a 0,2 gramos de PEG/mL DCM). PEG-AC se fabrica bajo argón haciendo reaccionar una solución de DCM de PEG-OH con cloruro de acrililoilo y trietilamina (relaciones molares: OH 1: cloruro de acrililoilo 1,5: trietilamina 2, a 0,2 gramos de PEG/mL DCM). Dichos grupos químicos se pueden unir a moléculas de PEG linealizadas, de 2 brazos, de 4 brazos o de 8 brazos. Se apreciará que los anticuerpos de la invención pueda producirse utilizando ingeniería genética (donde un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención se
50 introduce en una célula anfitriona apropiada donde se sintetiza el anticuerpo. Ejemplos de secuencias se proporcionan en las SEQ. ID. NO: 26 y NO: 27) o por síntesis química tal como por técnicas en fase sólida.

Como se emplea en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "incluido", "que tiene" y sus conjugados significan "incluido pero no limitado a".

- 55 El término "que consiste en" significa "incluido y limitado a".

El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, pasos y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicados.

Como se usa en la presente memoria, la forma singular "un" y "el" incluyen referencias plurales y femeninas a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluidas sus mezclas.

- En toda esta solicitud, varias realizaciones de esta invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo tiene que describir específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha descrito específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como a cada uno de los números dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

- Siempre que se indica un intervalo numérico en la presente memoria, significa que incluye cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado "y" un segundo número indicado se emplean en la presente memoria indistintamente y se pretende que incluyan el primer y segundo números indicado y todos los números fraccionarios y enteros entre ellos.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada, incluidos, entre otros, esas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos de los profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

- Cuando se hace referencia a listas de secuencias concretas, debe entenderse que dicha referencia también abarca secuencias que corresponden sustancialmente a su secuencia complementaria incluidas variaciones de secuencia menores, que resultan de, p. ej., errores de secuenciación, errores de clonación u otras alteraciones que dan lugar a la sustitución de bases, eliminación de bases o adición de bases, siempre que la frecuencia de dichas variaciones sea menor que 1 en 50 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 100 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 200 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 500 nucleótidos, alternativamente, menos de 1 en 1.000 nucleótidos, alternativamente, menos de 1 en 5.000 nucleótidos, alternativamente, menos de 1 en 10.000 nucleótidos.

- Se aprecia que determinadas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones independientes, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, varias características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de varias realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin esos elementos.

- Varias realizaciones y aspectos de la presente invención, tal como se describe anteriormente en la presente memoria y como se reivindica en el apartado reivindicaciones a continuación, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

- Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no restrictiva.

- En general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ingeniería genética. Dichas técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual", Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland. (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant ADN", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las indicadas en las patentes de EE.UU. nº 4.666.828; nº 4.683.202; nº 4.801.531; nº 5.192.659 y nº 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique", de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT. (1994); Mishell and Shiigi (eds.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoanálisis disponibles están descritos ampliamente en las patentes y en la bibliografía científica; véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. nº 3.791.932; nº 3.839.153; nº 3.850.752; nº 3.850.578; nº 3.853.987; nº 3.867.517; nº 3.879.262; nº 3.901.654; nº 3.935.074; nº 3.984.533; nº 3.996.345; nº 4.034.074; nº 4.098.876; nº 4.879.219; nº 5.011.771 y nº 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal

Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology", vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).

- 5 Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en la presente memoria son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos experimentales.

- Transfección y expresión de proteínas de CD84-ECD segregada: Para la expresión y secreción de la proteína CD84-ECD (SEQ ID NO: 15), se sembraron células HEK 293T en frascos de cultivo celular de 175 cm³ a una confluencia final del 75% 24 h antes de la transfección. Para la transfección, se utilizaron 30 ml de medio DMEM completo y 3 ml de solución que contenía precipitado de ADN. Los cultivos se incubaron 24 horas más después de la transfección y a continuación el medio se cambió a DMEM sin suero durante 2 días. Se recogió el medio acondicionado; se centrifugó durante 1 hora a alta velocidad para eliminar las células y los residuos, se filtró con una unidad de filtro de 0,2 µm y se realizó la purificación de proteínas del medio acondicionado utilizando FLPC (cromatografía de afinidad de níquel). Después de la unión de la proteína a la columna de Ni²⁺, se lavó y se eluyó con altas concentraciones de imidazol, que compite con la etiqueta His6 y desplaza la proteína. Después de la purificación, muestras concentradas de cada etapa de purificación y de los diferentes picos se analizaron por SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia western y tinción Coomassie del gel.
- 20 Cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel): Las fracciones agrupadas y concentradas de la cromatografía de afinidad con Ni²⁺ se cargaron en una columna 16/60 Superdex 200 (grado preparativo) mediante inyección en el sistema FPLC. Las proteínas se eluyeron a un caudal de 5 ml/min con PBS. Las fracciones se recogieron según la absorción de UV y los cambios en el pH de los eluidos. Después de agrupar y concentrar las fracciones de diferentes picos, las muestras se analizaron por SDS-PAGE, seguido de transferencia de Western y tinción con Coomassie.

Identificación de proteínas por ESI-MS/MS: Con objeto de verificar la identidad de la proteína CD84-ECD, la banda presunta del gel teñido con Coomassie se escindió y analizó por digestión proteolítica seguida de espectrometría de masas con ionización por electroatomización. El procedimiento lo llevó a cabo la Unidad de Servicio Biológico del Instituto Weizmann.

- 30 Protocolo de hibridoma: Se purificó la proteína CD84-ECD (como se describió anteriormente) en un medio acondicionado procedente de 293 células transfectadas con el montaje CD84-ECD. Los ratones se inmunizaron con CD84-ECD purificada durante un período de 3 meses. Tras la hemorragia de la prueba de ELISA positiva para anticuerpos contra CD84-ECD (las placas se recubrieron con ECD-CD84 purificada), se extrajeron los bazo; se aislaron los linfocitos (con HBSS) y se fusionaron con células NSO (proporción de 1:5) junto con polietilenglicol (PEG). Se seleccionaron hibridomas con medio HAT (Hipoxantina Aminopterina Timidina) y se analizó su sobrenadante para reconocimiento de CD84-ECD utilizando el ensayo ELISA [Ho M. K., Springer T. A. *Methods Enzymol.* 1984; 108: 313-324].

- ELISA para la detección de subclases de hibridomas: Se demostró que los hibridomas son de IgM, clase k de mediante un equipo ELISA comercial. En resumen, los sobrenadantes de cultivos libres de células se recolectaron de hibridoma, y se determinaron las concentraciones de IgM, IgG3, IgG1, αb, αa, Δ, λ, κ utilizando métodos ELISA según las instrucciones del fabricante (BD Bioscience).

Activación/bloqueo del hibridoma: Se agregó el hibridoma B1/B4/F8 a las células de CLL que crecían en medio RPMI que contenía 10% (v/v) de FCS incubado a 37°C durante 18 h (para extracción de ARN) y 24 h (para extracción de proteínas), con o sin estimulación de MIF.

- 45 Población de pacientes con CLL: Se extrajeron linfocitos B de la sangre periférica tanto de sujetos sanos (normales/referencia) como de pacientes con CLL que cumplían con los criterios de diagnóstico e inmunofenotipo para la CLL, en diversas fases de la enfermedad. Las células las proporcionó el Hematology Institute del Kaplan y el Sourasky Medical Center, según el IRB del hospital, como se describió anteriormente [Haran M. *et al.*, *Leukemia*. 2004; 18: 1948-1950]. El diagnóstico de CLL se basó en criterios habituales y los pacientes se clasificaron según el sistema de estadiaje de Rai [Hallek M. *et al.*, *Blood* 2008; 111: 5446-5456].

- Purificación celular: Se purificaron linfocitos B utilizando a mezcla de anticuerpos RosettSep (StemCell Vancouver, BC, Canadá) como se describió anteriormente [Lantner F. *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci. USA* 2007; 104: 13408-13413]. En resumen, este método se basa en la selección negativa de linfocitos B. Se agregaron 50 µl de la mezcla que contiene anticuerpos divalentes dirigidos a antígenos distintos de linfocitos B (CD3, CD2, CD16, CD56 y CD14) a cada mililitro de sangre completa. Después de una incubación de 20 minutos, se añadió una cantidad igual de PBS a la mezcla y las células se pusieron en un gradiente de Ficoll, se centrifugaron y se aislaron del ficoll mediante lavados con PBS. Las células se usaron frescas o posiblemente congeladas en suero de ternera fetal (FCS) más

10% de sulfóxido de dimetilo (DMSO) para almacenamiento en nitrógeno líquido. Las células congeladas se cultivaron durante la noche en CO₂ al 5% en RPMI con 10% de FCS y antibióticos.

Células M210B4: Se adquirieron células M2-10B4 de ATCC (ATCC® CRL-1972™). Esta estirpe celular es un clon procedente de células estromales de médula ósea de un ratón F1 (C57BL/6J × C3H/HeJ). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 enriquecido con 10% de FCS y penicilina-estreptomicina-glutamina y se cultivaron en 37°C en 5% de CO₂.

Células de tumores sólidos: Se adquirieron en ATCC *MDA435* (cáncer de mama humano), *PC-3* (cáncer de próstata humano), *Hela* (cáncer de cuello uterino humano), *A375* (melanoma maligno humano; CRL 1619), *A549* (adenocarcinoma de pulmón humano), *PAC1* (cáncer de páncreas humano; 39532) y *NCL-N87* (cáncer gástrico humano). Las células se cultivaron en medio DMEM, enriquecido con 10% de FCS y penicilina-estreptomicina-glutamina y se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂.

Células Daudi: Se adquirió en ATCC la estirpe celular de linfoma de Burkitt, Daudi, (ATCC® CCL-213™). Se cultivaron 1 × 10⁶ células Daudi en medio RPMI que contenía un 10% de FCS con diferentes concentraciones de los anticuerpos anti-CD84 B1 o B4 o con un anticuerpo de referencia. Después de 48 horas, se examinó la supervivencia celular utilizando tinción anexa (como se describe a continuación).

Anticuerpos: Para tinción FACS anti CD84-PE (CD84.1.21 Bio Legend). Para bloqueo: Anticuerpo CD84 antihumano purificado LEAF™ (CD84.1.21 Bio Legend).

Citometría de flujo: La tinción de células de CLL se realizó como se describió anteriormente [Binsky I. *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci. USA* 2007; 104: 13408-13413]. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: CD-19 (MiltenyiBiotec, Auburn, CA), anti-CD74 (Santa Cruz), referencia de isotipo IgG1k (MOPC-21, BD Biosciences), CD49d (9F10, BD Biosciences), anti-CD84 (Ab-2, 152-1D5 Labvision), seguido de anti-anticuerpo secundario PE de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories) o anti-CD84-PE (CD84.1.21 Bio Legend), anti-anticuerpo PE de CCR1/CCR5 humano (BioLegend), anti-anticuerpo PE de IgM de ratón, RMM-1 (BioLegend), anti-anticuerpo APC de ratón/humano CD45R/B220, RA3-6B2 (BioLegend), de anti-ratón CD5 eFluor®, 450 53-7.3 (eBioscience). La tinción se analizó por FACSCanto (BD Biosciences).

Tinción intracelular para Bcl-2: Se permeabilizaron y se fijaron las células usando la solución FXP3 Fix/Perm de BioLegend durante 20 minutos a temperatura ambiente, a continuación se lavaron dos veces con amortiguador de tinción celular y nuevamente con amortiguador FXP3 Perm de BioLegend. A continuación, las células se incubaron con el amortiguador FXP3 Perm de BioLegend durante 15 minutos en la oscuridad y después se tiñeron durante 30 minutos en hielo con anti-anticuerpo PE anti-Bcl-2 (BCL/10C-4, Biolegend) o control con anti-isotipo. La tinción celular se evaluó en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences).

Detección de muerte celular: tinción con Anexina y PI/7AAD: Se cultivaron células de CLL purificadas en placas de 24 pocillos a 1 × 10⁷ células/pocillo en medio RPMI enriquecido con FCS al 10%, con o sin 1,5-2 g de anti-CD84 (ab-3202 Abcam/152-1D5 Thermo) seguido de 0,5 µg de anti Fab (Jackson) o un anticuerpo de control de isotipo IgG (MOPC-21 BioLegend) durante 24 y 48 h. Las células se centrifugaron, se lavaron y se tiñeron con Anexina (BD Biosciences), y se añadió yoduro de propidio (PI; 25 µg/ml) (Sigma) o 7AAD (BD Biosciences) durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. La extensión de la tinción con Annexin + PI/7AAD se analizó por FACSCanto (BD Biosciences).

Equipo de detección de apoptosis Magic Red: Se incubaron 10⁷ células de CLL por ml a 37°C durante 1 h con Magic Red (Kit de detección de caspasa Magic Red para caspasa 3 y 7 MR-(DEVD)2 Immunochemistry Technology) según las instrucciones del fabricante. Luego, se midió la tinción con Magic Red por análisis FACSCalibur (BD Biosciences).

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA): Se cultivaron células de CLL con un agonista anti-CD84 o anticuerpo bloqueador o hibridoma B4, como se describió anteriormente durante 48-72 h. Los cultivos conjuntos de células de CLL y células NLC/M210B4 se bloquearon para CD84 usando un anticuerpo antagonista o hibridoma B4 bloqueador como se describió anteriormente.

Se recogieron a continuación los sobrenadantes de cultivos sin células y se determinaron las concentraciones de hCCL3 y mL6 utilizando un método ELISA según las instrucciones del fabricante (sistemas de I + D DuoSet ELISA CCL3 humano/IL6 de ratón).

Bloqueo de CD84 en cultivos conjuntos de CLL y M210B4: 1 × 10⁵ células del estroma se sembraron por pocillo en placa de 24 pocillos. Después de 18 h, se añadieron 1,6 × 10⁶ células de LLC en cada pocillo, en presencia o ausencia de anticuerpo bloqueador anti-CD84 (5 µg/µl) o hibridoma B4 (2,5-5 µg/µl) o referencia de isotipo y se cultivaron durante otras 48 h para el ensayo de viabilidad de células de CLL o 72 h para ELISA de CCL3.

Bloqueo de CD84: se realizó como se describió anteriormente [Binsky-Ehrenreich *et al.* E. Pub. 25 de febrero de 2013 *Oncogene*]. En resumen, se incubaron 1 × 10⁷ células de CLL en medio RPMI que contenía un 0,1% (v/v) de FCS a 37°C durante 3 h. A continuación, las células se volvieron a poner en suspensión en un medio que contenía

2,5 µg de anti CD84 (CD84.1.21 BioLegend) o mediante hibridoma B4 de 2,5-5 µg (véase material y métodos) y se incubaron a 37°C durante 18 h (para extracción de ARN) y 24-72 h (para extracción de proteínas, tinción intracelular y ELISA).

- 5 Análisis de PCR-transcripción inversa en tiempo real: Se analizaron las concentraciones de ARNm de CD84, Rp2, Bcl-2, CCL3, IL6 y VCAM humanos por RT-PCR cuantitativa en tiempo real utilizando un instrumento Light-Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El volumen de reacción (10 µl) contenía MgCl₂ 3 mM, LightCycler HotStart ADN SYBR Green I mix (Roche Diagnostics), pares de cebadores específicos y 2,5 µl de ADNc. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C seguidos de 40-60 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y 15 segundos a 72°C. La PCR se realizó por duplicado como se describió anteriormente [Luger
- 10 D. *et al.*, *J. Clin. Immunol.* 2004; 24: 579-590].

Las secuencias de cebadores fueron las siguientes:

hBcl-2: 5'GGATCAGGGAGTTGGAAG3' GCACTGCCAAACGGAG (SEQ ID NO: 16-17, respectivamente).

hCCL3: 5'CGAGCAGCCAGTGCTCCAAGC 3'GGCTGTTTGCAACAACCAGTCCA (SEQ ID NO: 18-19, respectivamente).

- 15 Bcl-2 de ratón: 5'GCTACCGTCGTGACTT 3' GCCGGTTCAGGTACTC (SEQ ID NO: 20-21, respectivamente).

IL6 de ratón: 5' CCACTTCACAAGTCGGAGGCT TA 3'GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC (SEQ ID NO: 22-23, respectivamente).

VCAM1 de ratón: 5' TACCAGCTCCCAAAATCCTG 3'TCTGCTAATTCCAGCCTCGT (SEQ ID NO: 24-25, respectivamente).

- 20 Las concentraciones de RP-2 se utilizaron para normalizar las muestras para el cálculo de los niveles de expresión relativos de otros genes.

CD84: 5'TTGTTCCTGTTTGTTCAGAG 3'CGGAATAAACTGTGTTCAGT^h (SEQ ID NO: 28-29, respectivamente).

Disminución de CD84 por ARNs: ON-TARGETplus SMARTpool, CD84 humano (NM_003874), Dharmacon, se usó para la disminución de CD84.

- 25 Ratones: Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Investigación Animal en el Instituto Weizmann.

Ratones TCL1 como modelo para la leucemia linfocítica crónica: Se determinó el porcentaje de población cancerosa en diversas edades de ratones TCL-1. Se obtuvieron células esplénicas de ratones TCL-1 de 18, 11 y 6 meses de edad y se analizaron para determinar su población B220+CD5+ por FACSCanto (BD Bioscience).

- 30 Los linfocitos B esplénicos se incubaron a continuación con anti-CD84 (B1 o B4) o un anticuerpo de referencia compatible con el isotipo en el medio de Iscove que contenía FCS al 2% durante 48 h. La supervivencia celular se analizó por tinción con anexina-7AAD (como se describió anteriormente).

- Modelo de xenoinjerto para CLL: Se marcaron células de CLL con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína 5 µM (CFSE; Anaspec) durante 5 minutos a 37°C. CFSE no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia celular en todo el experimento. Se inyectaron iv a continuación 1 x 10⁷ células en ratones transgénicos con C57BL/6 de referencia y CD84. El retorno de células de CLL al bazo, M.O. y PB se determinó 1 h y 4 h después por análisis FACS de células aisladas de tejidos.
- 35

- Linfocitos B normales: Se obtuvieron linfocitos B esplénicos de ratones C57BL/6 de 6, 8 y 11 meses de edad. Las células se aislaron y se estimularon con 5 µg/ml de anticuerpos anti-CD84 B1 o B4, y se compararon con el efecto de un anticuerpo de referencia de isotipo coincidente.
- 40

- Modelo Eµ-TCL1 para CLL: Se usaron ratones transgénicos Eµ-TCL1 para seguir la evolución de la CLL controlando la expansión de linfocitos B CD5⁺ como se describió previamente [Bichi R. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002. 99: 6955-6960]. Se generaron ratones híbridos mediante el trasplante de ratones transgénicos WT y CD84 con 5 x 10⁶ células de la M.O. de ratones Eµ-TCL1. Después de 4, 6, 8 y 13 meses, la cavidad peritoneal, el PB, el bazo y la M.O. de los ratones receptores se sacrificaron y se extrajeron las células, se tiñeron para CD5 (450 53-7.3 (eBioscience), IgM (RMM-1 BioLegend), y B220 (RA3-6B2 (BioLegend) y se analizaron por FACSCanto (BD Bioscience).
- 45

Ejemplo 2

El anticuerpo B4 provoca apoptosis en células CLL

- 50 Los presentes inventores han determinado si los anticuerpos B4 generados según las presentes instrucciones son

capaces de provocar apoptosis en células CLL humanas primarias. Como se demuestra en las figuras 1A-D, el anticuerpo B4 derivado del hibridoma, provocó la muerte celular en células de CLL cultivadas solas (figuras 1A-B). Como se mostró anteriormente, diferentes tipos de células estromales, como las células humanas primarias tipo Nurse (NLC) y las células estromales medulares (MSC) (estirpe celular M210B4, CRL-1972™) protegen las células de CLL en el cultivo conjunto de la apoptosis, y son una parte integral del microentorno de la CLL (Burger J. A. *et al.*, *Blood*. 2009. 114: 3367-3375, Kurtova A. V. *et al.*, *Blood*. 2009. 114: 4441-4450). Curiosamente, el anticuerpo derivado del hibridoma B4 superó el efecto protector del estroma y provocó la muerte de la CLL cuando se cultivó conjuntamente con células M210B4 (figuras 1C-D). Por lo tanto, el hibridoma B4 puede usarse como un anticuerpo bloqueador. La medición de la apoptosis incluye todas las células positivas a anexina (simple y doble) la población total positiva a anexina aumenta del 46,18% al 55,75%.

Ejemplo 3

CD84 regula un efecto antiapoptótico en las células estromales B4 de la médula ósea

Se ha sugerido anteriormente que las células de CLL pueden manipular activamente su microentorno [Binder M. *et al.*, *PLoS One*. 2012.5 (12): e15992, Neil E. Kay *et al.*, *Leuk. Res.* julio de 2007; 31 (7): 899-906]. Específicamente, se ha demostrado recientemente que las células de CLL provocan efectos antiapoptóticos en sus contrapartes estromales en el cultivo. La interacción de células del estroma con CLL provoca la expresión y secreción de citocinas específicas (es decir, IL-6, IL-8) del estroma e induce la expresión de moléculas de adhesión específicas como ICAM-1, mientras que la expresión de otras moléculas de adhesión (es decir, VCAM-1) permanece sin cambios [Plander M. *et al.*, *Annals of Hematology*. 2011.90 (12): 1381-90].

Para determinar si la interacción de las células del estroma con las de CLL mediada por CD84 induce una cascada similar en el estroma, se cultivaron células de CLL con células estromales M210B4 en presencia o ausencia de un hibridoma bloqueador de CD84 (B4) como se describió anteriormente (figuras 1C-D), y se controlaron la expresión del gen Bcl-2 antiapoptótico (figura 2A), la citocina IL-6 (figura 2B) y VCAM-1 (figura 2C) en las células M210B4. La incubación con células de CLL elevó las concentraciones de ARNm de Bcl-2 e IL-6 en células M210B4, mientras que no se observaron cambios en el mensaje de VCAM-1.

Curiosamente, el bloqueo de CD84 redujo los niveles de mensaje de Bcl-2 (figura 2A) e IL-6 (figura 2B), mientras que los niveles de VCAM-1 no se vieron afectados por este bloqueo (figura 2C).

Ejemplo 4

CD84 regula la expresión de CCL3 en cultivos conjuntos con B4

Anteriormente se demostró que las células de CLL pueden incorporar activamente células y crear un microambiente solidario mediante la secreción de CCL3 [Zucchetto A. *et al.*, *Cancer Res.* 2009.69 (9): 4001-4009. Burger J. A. *et al.*, 2009. 113: 3050-3058]. La estimulación de CD84 expresada en células de CLL produce la expresión y secreción de CCL3 (resultados no publicados de los inventores). Para demostrar directamente el papel regulador de CD84 en la secreción mediada por CCL3 en el cultivo conjunto de células CLL y del estroma, se analizaron los niveles segregados de CCL3 en los sobrenadantes procedentes de los cultivos conjuntos de células del estroma CLL, que se incubaron en presencia o ausencia de un hibridoma (B4) bloqueador de CD84 o un anticuerpo de control de isotipo. Como se demuestra en la figura 3, el bloqueo de CD84 en el cultivo conjunto de CLL y M210B4, disminuyó los niveles de CCL3 humano, procedente de las células de CLL, segregado al medio condicionado según se detectó por ELISA (figura 3).

Asimismo, se analizó la secreción de CCL3 de células de CLL cultivadas junto con células NLC en presencia o ausencia de anticuerpo bloqueador anti-CD84. El bloqueo de CD84 redujo significativamente la secreción de CCL3 procedente de las células de CLL al medio acondicionado (datos no mostrados). Sin embargo, como las NLC son de origen humano, se comprobó además que CD84 regula específicamente la secreción de CCL3 procedente de las células CLL en estos cultivos conjuntos. Por lo tanto, se analizaron las concentraciones de ARNm de CCL3 en células de CLL cultivadas con células NLC y demostraron una expresión reducida del mensaje de CCL3 en células de CLL (datos no mostrados).

Por lo tanto, la interacción de CLL con el microentorno está mediada por CD84, que estimula la secreción de CCL3 procedente de células CLL.

Ejemplo 5

Comparación entre los anticuerpos F8, B1 y B4

Como se muestra en Las figuras 4A-H y en la tabla 1 a continuación, los anticuerpos de algunas realizaciones de la invención (B1 y B4) fueron capaces de destruir mayormente células CLL purificadas, como se demuestra por el mayor porcentaje de células apoptóticas (figuras 4A-D), y las células de Ramos (RA-1) del linfoma de Burkitt (ATCC CRL-1596™, figuras 4E-H) en comparación con un anticuerpo de bloqueo descrito en la técnica (F8, publicación PCT n° WO2010/035259).

Tabla 1: Comparación de apoptosis de células CLL por los anticuerpos F8, B1 y B4

	CCL purificada (% de apoptosis)	Células Ramos (% de apoptosis)
F8	34	16
B1	73	45
B4	75	39

Ejemplo 6

Los ratones CD84KO presentan un número reducido de células de CLL humanas en su M.O.

- 5 Para estudiar la supervivencia y la distribución de células de CLL humanas en los diferentes compartimentos de ratones trasplantados, las células de CLL primarias humanas se marcaron de forma fluorescente con CFSE. Las células se inyectaron a continuación a ratones CD84KO y WT. Después de 4 horas, se comparó el número de células que residían en los diferentes compartimentos, y se calculó la proporción entre el número de células en la M.O. y el bazo de cada ratón. Como se muestra en las figuras 5A-B, la proporción de células de CLL detectadas en la M.O. de los ratones de referencia se redujo significativamente en ratones CD84KO (figura 5A). Para determinar si este fenómeno es el resultado de un deterioro en la llegada de las células de CLL al compartimiento de la M.O. en ratones CD84KO, o debido a su incapacidad para mantenerse o sobrevivir en este compartimiento, las células de CLL se inyectaron a ratones CD84KO o WT y la movilización de las células a la M.O. se siguió 1 hora después de la inyección. Como se muestra en la figura 5B, la concentración de células de CLL en la M.O. después de 1 hora fue similar en ratones WT y CD84 KO (figura 5B). Este resultado podría sugerir que las células de CLL se movilizan normalmente a la M.O. que carece de expresión de CD84 en el microentorno. El número reducido de células detectadas en la M.O. en un momento posterior es posiblemente debido a la incapacidad de las células para mantenerse o sobrevivir en el microentorno de la M.O. en ausencia de la señal de CD84.

*Ejemplo 7*20 *Evaluación de reactividad cruzada de especies*

Se utilizó Eμ-TCL1 un modelo de ratón transgénico de la enfermedad CLL. En los ratones transgénicos Eμ-TCL1, hay una acumulación de B220 bajo en linfocitos B IgM+CD5 + en la cavidad peritoneal, sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides de los ratones. Los linfocitos B IgM+CD5+ expresan CD84 en su superficie (figura 6A).

- 25 Se determinó a continuación si el bloqueo de la actividad de CD84 con los anticuerpos B1 y B4 se producía la muerte celular. En primer lugar, se determinaron los porcentajes de población cancerosa en varias edades de ratones TCL-1. Se analizaron células esplénicas procedentes de ratones TCL-1 de 18, 11 y 6 meses de edad para determinar su población B220+CD5+ por FACS. Si bien la mayoría de las células esplénicas de los ratones TCL-1 de 18 y 11 meses de edad fueron las células malignas (B220+CD5+), la población B220+CD5+ difícilmente se pudo detectar en bazo de ratones TCL-1 de 6 meses de edad (figuras 6B-D). A continuación, se siguió el efecto de los anticuerpos sobre la supervivencia celular. Los linfocitos B esplénicos malignos se incubaron con anti-CD84 (B1 o B4) o un anticuerpo de referencia de isotipo coincidente en medio de Iscove que contiene 2% de FCS. 48 h después, se analizó la supervivencia celular por tinción con anexina-7AAD. Como puede verse en las figuras 6E-M, el bloqueo de CD84 con anticuerpos B1 y B4 produjo apoptosis en la población cancerosa B220+CD5+. Sorprendentemente, la supervivencia de la población de linfocitos B B220+CD5- periféricos no malignos no se vio afectada por este tratamiento (como se describe en las figuras 9A-J). Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-CD-84 humanos, B1 y B4, pueden bloquear a CD84 murino en células de ratón malignas y reducir su supervivencia.

*Ejemplo 8**Análisis de la expresión de CD84 en tumores*

- 40 Varias estirpes celulares expresan CD84 como se ilustra en la dirección de Internet www.broadinstitute.org/ccle/. La mayoría de las estirpes celulares pertenecen al origen hematopoyético, sin embargo, se seleccionaron algunos tumores sólidos para analizar la expresión de CD84. Se extrajo ARNm de diferentes estirpes celulares de tumores sólidos: MDA435 (cáncer de mama humano), PC-3 (cáncer de próstata humano), Hela (cáncer de cuello uterino humano), A375 (melanoma maligno humano), A549 (adenocarcinoma de pulmón humano), PAC1 (cáncer de páncreas humano) y NCL-N87 (cáncer gástrico humano). El mensaje CD84 fue analizado por RT-PCR. Como puede verse en la figura 7A, el ARNm de CD84 no se detectó en ninguna de estas células.

El análisis de la cascada inducida por CD84 en CD84 que expresa células tumorales hematopoyéticas se llevó a cabo en la estirpe celular de linfoma de Burkitt, Daudi. Como puede verse en la figura 7B, las células Daudi expresan

CD84 en su superficie celular.

A continuación, se determinó el efecto de los anticuerpos anti-CD84 B1 y B4 sobre la inducción de la apoptosis en células Daudi. Se cultivaron células Daudi con diferentes concentraciones de los anticuerpos B1 o B4 anti-CD84 o con un anticuerpo de referencia. Después de 48 horas, se examinó la supervivencia celular utilizando tinción con Anexina. El bloqueo de CD84 provocó la muerte de las células Daudi (en la figura 7C se muestra una concentración representativa).

Ejemplo 9

Análisis de la expresión y función de CD84 en tejidos normales

Varios tejidos normales expresan CD84 como se ilustra en la dirección de Internet www.gtexportal.org/home/. Como se muestra en la misma, CD84 se expresa principalmente en células transformadas con EBV y en el bazo.

Se analizó el papel de CD84 como receptor de supervivencia en tejidos normales. Se compararon los niveles de expresión de CD84 en células sanas y de CLL de pacientes en diversas fases de la enfermedad. Los linfocitos B purificados de sujetos sanos, así como las células de CLL en fase inicial y avanzada se analizaron para detectar la presencia de ARNm de CD84 (que se dirige a un segmento común a todas las isoformas). Como se muestra en las figuras 8A-B, se detectaron bajas concentraciones de ARNm de CD84 en linfocitos B normales, mientras que se observaron concentraciones elevadas de ARNm de CD84 en todos los pacientes con LLC, independientemente de la fase de la enfermedad.

Además, las concentraciones de CD84 en la superficie celular fueron significativamente más altas en todas las células de CLL en comparación con el total (figuras 8C-E) o linfocitos B CD5+ normales (figura 8F). Por lo tanto, los linfocitos B normales expresan CD84 en concentraciones más bajas.

A continuación, se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-CD84 B1 y B4 sobre la supervivencia de linfocitos B normales. Se aislaron linfocitos B esplénicos procedentes de ratones C57BL/6 de 6, 8 y 11 meses de edad, con 5 µg/ml de anticuerpos anti-CD84 B1 o B4, y se compararon con el efecto de un anticuerpo de referencia de isotipo coincidente. Como se puede ver en las figuras 9A-J, tanto B1 como B4 no tuvieron efecto en la viabilidad de los linfocitos B periféricos normales. Estos resultados sugieren que, si bien los anticuerpos B1 y B4 pueden bloquear la actividad de CD84 murino en células malignas de ratón y reducir la supervivencia celular (figura 6C), no provocan apoptosis en linfocitos B normales.

Ejemplo 10

Análisis de la expresión de CD84 en el microentorno tumoral

Se siguió la expresión de CD84 en células estromales de médula ósea (MSC) y células de la enfermera (NLC) presentes en el microentorno tumoral. Para las MSC, se utilizaron las MSC primarias de médula ósea procedentes de pacientes con LLC, estas células se aislaron y se cultivaron como se describió anteriormente [Kay *et al.*, *Leukemia Research* 31, 899-906 (2007)] y las estirpes de MSC murinas (M210B4) de ratón F1 también se utilizaron. Se demostró que estas estirpes celulares protegen las células de CLL de la apoptosis espontánea e inducida por fármacos [Kurtova *et al.*, *Blood* 114, 4441-4450 (2009)]. Las NLC se aislaron y se cultivaron como se describió anteriormente [Burger *et al.*, *Blood* 96, 2655-2663 (2000)].

Como se mostró anteriormente, se detectó ARNm de CD84 en células de CLL (figura 10 A). Además, se detectó ARNm de CD84 en células M210B4 así como en NLC (figura 10 A). A continuación, se analizó la expresión de CD84 en la superficie de estas células. Como se muestra en la figura 10B, además de su expresión en células de CLL, se detectó CD84 en la superficie de NLC así como en células estromales M210B4. Esto sugiere que CD84 podría estar involucrado en la interacción célula-célula entre las células de CLL y su microentorno.

Ejemplo 11

Análisis de la función de CD84 en la regulación de la protección inducida por microentornos de la apoptosis espontánea e inducida por fármacos de la CLL

Para determinar si CD84 desempeña una función en la interacción de las células de CLL con su microentorno que da como resultado supervivencia celular, las células de la CLL se cultivaron junto con células del estroma (como se describió anteriormente) en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueadores anti-CD84. M210B4 (figuras 11A-G) provocó un efecto antiapoptótico en las células de CLL, medido por la tinción con Anexina-PI/7AAD (descrita en detalle en el ejemplo 1 anterior). El bloqueo de CD84, por el hibridoma B4 (figuras 11A-C), superó parcialmente el efecto antiapoptótico inducido por el estroma, dando como resultado la inducción de la muerte celular de la CLL.

A continuación, los presentes inventores querían determinar si la apoptosis inducida por el bloqueo de CD84 era un efecto directo sobre las células de CLL, o si los anticuerpos podían evitar la interacción de las células de CLL con el estroma, provocando así su muerte. Por lo tanto, la expresión de CD84 disminuyó en las células M210B4 por ARNsi. A continuación se agregaron células de CLL al cultivo y se controló su supervivencia. Como se demuestra en la

figura 11D-G, la eliminación de CD84 redujo específicamente la supervivencia mediada por estroma de las células de CLL. Por lo tanto, CD84 expresado en el estroma media la supervivencia de las células de CLL por contacto célula a célula. Para demostrar aún más la función de CD84 expresada en el microentorno en la supervivencia de las células de CLL, CD84 expresado en M210B4 fue bloqueado por los anticuerpos B1 y B4. Después de 1 hora, los anticuerpos se lavaron y a continuación se agregaron células de CLL al cultivo conjunto. 48 horas después, se midió la supervivencia celular mediante tinción con anexina-7AAD. El bloqueo de CD84 del estroma provocó significativamente la apoptosis de las células de CLL (figuras 12A-D), lo que sugiere que la supervivencia inducida por el estroma está mediada por la interacción CLL estromal con CD84.

Listado de secuencias

- 10 <110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
SHACHAR, Idit
BINSKY, Inbal
MAROM, Ayelet
- <120> Anticuerpos anti cd84, composiciones que los comprenden y uso de los mismos
- 15 <130> 60794
- <150> US 61/936,361
<151> 2014-02-06
- <160> 29
- <170> PatentIn version 3.5
- 20 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> B4-CDR1 de cadena pesada
- <400> 1
Ser Tyr Trp Met Gln
1 5
- <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> B4-CDR2 de cadena pesada
- <400> 2
Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
- 35 Gly
- <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> B4-CDR3 de cadena pesada
- <400> 3
Leu Leu Arg Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
- <210> 4
- 45 <211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

<220>
<223> B4-CDR1 de cadena ligera

<400> 4
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1          5          10

5 <210> 5
  <211> 7
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> B4-CDR2 de cadena ligera

  <400> 5
  Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
  1          5

  <210> 6
  <211> 9
15 <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> B4-CDR3 de cadena ligera

  <400> 6
  Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
20 1          5

  <210> 7
  <211> 5
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

25 <220>
  <223> B1-CDR1 de cadena pesada

  <400> 7
  Ser Phe Gly Met His
  1          5

  <210> 8
30 <211> 17
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> B1-CDR2 de cadena pesada

35 <400> 8
  Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
  1          5          10          15

  Gly

  <210> 9
  <211> 10
  <212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> B1-CDR3 de cadena pesada

  <400> 9
  Trp Gly Trp Thr Gly Thr Gly Leu Asp Tyr
  1          5          10

```

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> B1-CDR1 de cadena ligera
 <400> 10
 Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His
 1 5 10
 <210> 11
 10 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> B1-CDR2 de cadena ligera
 15 <400> 11
 Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> B1-CDR3 de cadena ligera
 <400> 12
 Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr Phe
 1 5 10
 25 <210> 13
 <211> 1067
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

ES 2 696 348 T3

```

cggctcaagt gaactgactc tgctagaaca gtgccgtgct tttccacaga aggttagacc      60
ctgaaagaga tggctcagca ccacctatgg atcttgctcc tttgcctgca aacctggccg      120
gaagcagctg gaaaagactc agaaatcttc acagtgaatg ggattctggg agagtcagtc      180
actttccctg taaatatcca agaaccacgg caagttaaaa tcattgcttg gacttctaaa      240
acatctgttg cttatgtaac accaggagac tcagaaacag caccgtagt tactgtgacc      300
cacagaaatt attatgaacg gatacatgcc ttaggtccga actacaatct ggtcattagc      360
gatctgagga tggagacgc aggagactac aaagcagaca taaatacaca ggctgatccc      420
tacaccacca ccaagcgcta caacctgcaa atctatcgtc ggcttgggaa accaaaaatt      480
acacagagtt taatggcatc tgtgaacagc acctgtaatg tcacactgac atgctctgta      540
gagaaagaag aaaagaatgt gacatacaat tggagtcccc tgggagaaga gggtaatgtc      600
cttcaaatct tccagactcc tgaggaccaa gagctgactt acacgtgtac agcccagaac      660
cctgtcagca acaattctga ctccatctct gcccggcagc tctgtgcaga catcgcaatg      720
ggcttccgta ctcaccacac cgggttgctg agcgtgctgg ctatgttctt tctgcttggt      780
ctcattctgt cttcagtgtt tttgttccgt ttgttcaaga gaagacaaga tgctgcctca      840
aagaaaacca tatacacata tatcatggct tcaaggaaca cccagccagc agagtccaga      900
atctatgatg aaatcctgca gtccaagtg cttccctcca aggaagagcc agtgaacaca      960
gtttattccg aagtgcagtt tgctgataag atggggaaag ccagcacaca ggacagtaaa     1020
cctcctggga cttcaagcta tgaaattgtg atctaggctg ctgggct                       1067

```

<210> 14

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

```

Met Ala Gln His His Leu Trp Ile Leu Leu Leu Cys Leu Gln Thr Trp
1              5              10              15

```

```

Pro Glu Ala Ala Gly Lys Asp Ser Glu Ile Phe Thr Val Asn Gly Ile
          20          25          30

```

ES 2 696 348 T3

Leu Gly Glu Ser Val Thr Phe Pro Val Asn Ile Gln Glu Pro Arg Gln
 35 40 45
 Val Lys Ile Ile Ala Trp Thr Ser Lys Thr Ser Val Ala Tyr Val Thr
 50 55 60
 Pro Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Val Thr Val Thr His Arg Asn
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Glu Arg Ile His Ala Leu Gly Pro Asn Tyr Asn Leu Val Ile
 85 90 95
 Ser Asp Leu Arg Met Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Lys Ala Asp Ile Asn
 100 105 110
 Thr Gln Ala Asp Pro Tyr Thr Thr Thr Lys Arg Tyr Asn Leu Gln Ile
 115 120 125
 Tyr Arg Arg Leu Gly Lys Pro Lys Ile Thr Gln Ser Leu Met Ala Ser
 130 135 140
 Val Asn Ser Thr Cys Asn Val Thr Leu Thr Cys Ser Val Glu Lys Glu
 145 150 155 160
 Glu Lys Asn Val Thr Tyr Asn Trp Ser Pro Leu Gly Glu Glu Gly Asn
 165 170 175
 Val Leu Gln Ile Phe Gln Thr Pro Glu Asp Gln Glu Leu Thr Tyr Thr
 180 185 190
 Cys Thr Ala Gln Asn Pro Val Ser Asn Asn Ser Asp Ser Ile Ser Ala
 195 200 205
 Arg Gln Leu Cys Ala Asp Ile Ala Met Gly Phe Arg Thr His His Thr
 210 215 220
 Gly Leu Leu Ser Val Leu Ala Met Phe Phe Leu Leu Val Leu Ile Leu
 225 230 235 240
 Ser Ser Val Phe Leu Phe Arg Leu Phe Lys Arg Arg Gln Asp Ala Ala
 245 250 255
 Ser Lys Lys Thr Ile Tyr Thr Tyr Ile Met Ala Ser Arg Asn Thr Gln
 260 265 270
 Pro Ala Glu Ser Arg Ile Tyr Asp Glu Ile Leu Gln Ser Lys Val Leu
 275 280 285
 Pro Ser Lys Glu Glu Pro Val Asn Thr Val Tyr Ser Glu Val Gln Phe
 290 295 300
 Ala Asp Lys Met Gly Lys Ala Ser Thr Gln Asp Ser Lys Pro Pro Gly
 305 310 315 320
 Thr Ser Ser Tyr Glu Ile Val Ile
 325

ES 2 696 348 T3

<210> 15
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Porción extracelular de CD84

<400> 15
 Met Ala Gln His His Leu Trp Ile Leu Leu Leu Cys Leu Gln Thr Trp
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Ala Gly Lys Asp Ser Glu Ile Phe Thr Val Asn Gly Ile
 20 25 30
 Leu Gly Glu Ser Val Thr Phe Pro Val Asn Ile Gln Glu Pro Arg Gln
 35 40 45
 Val Lys Ile Ile Ala Trp Thr Ser Lys Thr Ser Val Ala Tyr Val Thr
 50 55 60
 Pro Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Val Thr Val Thr His Arg Asn
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Glu Arg Ile His Ala Leu Gly Pro Asn Tyr Asn Leu Val Ile
 85 90 95
 Ser Asp Leu Arg Met Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Lys Ala Asp Ile Asn
 100 105 110
 Thr Gln Ala Asp Pro Tyr Thr Thr Leu Met Ala Ser Val Asn Ser Thr
 115 120 125
 Cys Asn Val Thr Leu Thr Cys Ser Val Glu Lys Glu Glu Lys Asn Val
 130 135 140
 Thr Tyr Asn Trp Ser Pro Leu Gly Glu Glu Gly Asn Val Leu Gln Ile
 145 150 155 160
 Phe Gln Thr Pro Glu Asp Gln Glu Leu Thr Tyr Thr Cys Thr Ala Gln
 165 170 175
 Asn Pro Val Ser Asn Asn Ser Asp Ser Ile Ser Ala Arg Gln Leu Cys
 180 185 190
 Ala Asp Ile Ala Met Gly Phe Arg Glu Phe Cys Arg Tyr Pro Ala Gln
 195 200 205
 Trp Arg Pro Leu Glu Ser Arg Gly Pro Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 210 215 220
 Glu Glu Asp Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His His
 225 230 235

<210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 16
 ggatcaggga gttggaag 18

 5 <210> 17
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 17
 gcactgcaa acggag 16

 <210> 18
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 18
 20 cgagcagcca gtgctccaag c 21

 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 19
 ggctgttgg caacaaccag tcca 24

 <210> 20
 30 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 35 <400> 20
 gctaccgtcg tgactt 16

 <210> 21
 <211> 16
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 21
 gccggtcag gtactc 16

 45 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 22
 ccacttcaca agtcggaggc tta 23

 <210> 23
 <211> 25
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 23
 10 gcaagtgcac catcgttgtt catac 25

 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 24
 taccagctcc caaaatcctg 20

 <210> 25
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 25 <400> 25
 tctgctaatt ccagcctcgt 20

 <210> 26
 <211> 11456
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> B4 -mulgG2a

 <400> 26

ES 2 696 348 T3

attgatcata atcagccata ccacatttgt agaggtttta cttgctttaa aaaacctccc	60
acacctcccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gttgttggtta acttgtttat	120
tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt	180
tttttcaactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg	240
gcggccgccg atatttgaaa atatggcata ttgaaaatgt cgccgatgtg agtttctgtg	300
taactgatat cgccattttt ccaaaagtga tttttgggca tacgcatat ctggcgatag	360
cgcttatatc gtttacgggg gatggcgata gacgactttg gtgacttggg cgattctgtg	420
tgtcgcgaaat atcgcagttt cgatataggt gacagacgat atgaggctat atcgccgata	480
gaggcgacat caagctggca catggccaat gcatatcgat ctatacattg aatcaatatt	540
ggccattagc catattattc attggttata tagcataaat caatattggc tattggccat	600
tgcatacgtt gtatccatat cataatatgt acattttatat tggctcatgt ccaacattac	660
cgccatgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag	720
ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct	780
gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc	840
caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gccacttgg	900
cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgcccctat tgacgtcaat gacggtaaat	960
ggcccgctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca	1020
tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc	1080
gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga	1140
gtttgttttg gcacccaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat	1200

ES 2 696 348 T3

tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gtcggttttag	1260
tgaaccgtca gatcgcttgg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagacacc	1320
gggaccgatc cagcctccgc ggccgggaac ggtgcattgg aacgcggatt ccccggtcca	1380
agagtgcagt aagtaccgcc tatagagtct ataggccac ccccttggct tcttatgcat	1440
gctatactgt ttttggcttg ggtctatac acccccgtt cctcatgtta taggtgatgg	1500
tatagcttag cctatagggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattggtgac	1560
gatactttcc attactaatc cataacatgg ctctttgcca caactctctt tattggctat	1620
atgccaatac actgtccttc agagactgac acggactctg tattttttaca ggatggggtc	1680
tcattttatta tttacaaatt cacatatata acaccaccgt ccccgagtgc cgcagttttt	1740
attaaacata acgtgggatc tccacgcgaa tctcgggtac gtgttcggga catgggctct	1800
tctccggtag cggcggtagg tctacatccg agccctgctc ccatgcctcc agcgactcat	1860
ggtcgctcgg cagctccttg ctctaacag tggaggccag acttaggcac agcacgatgc	1920
ccaccaccac cagtgtgccg cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc	1980
tcggggagcg ggcttgcacc gctgacgcat ttggaagact taaggcagcg gcagaagaag	2040
atgcaggcag ctgagttgtt gtgtctgat aagagtcaga ggtaactccc gttgcggtgc	2100
tgttaacggt ggagggcagt gtagtctgag cagtactcgt tgctgccgcg cgcgccacca	2160
gacataatag ctgacagact aacagactgt tcctttccat gggctctttc tgcagtcacc	2220
gtccttgaca cgaagcttgc cgccaccatg ggatggagct gtatcatcct cttcttggtta	2280
gcaacagcta caggtgaggt gaagctggtg gagtctgggg ctgagctggc aagacctggg	2340
gcttcagtga agttgtcctg caaggcttct ggctacacct ttactagcta ctggatgcag	2400
tgggtaaaac agagggcctg acagggctctg gaatggattg gggctattta tcctggagat	2460
ggtgatacta ggtacactca gaagttcaag ggcaaggcca cattgactgc agataaatcc	2520
tccagcacag cctacatgca actcagcagc ttggcatctg aggactctgc ggtctattac	2580
tgtgcaagat tactacgtac ctactggtac ttcgatgtct ggggcgcagg gaccacggtc	2640
accgtctcct cattcgaagc caaaacaaca gcccacatcg tctatccact ggcccctgtg	2700
tgtggagata caactggctc ctcggtgact ctaggatgcc tgggtcaaggg ttatttccct	2760
gagccagtga ccttgacctg gaactctgga tccctgtcca gtggtgtgca caccttccca	2820
gctgtcctgc agtctgacct ctacaccctc agcagctcag tgactgtaac ctcgagcacc	2880
tggcccagcc agtccatcac ctgcaatgtg gccacccgg caagcagcac caaggtggac	2940
aagaaaattg agcccagagg gcccaaatc aagccctgtc ctccatgcaa atgcccagca	3000
cctaaccctc tgggtggacc atccgtcttc atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc	3060

ES 2 696 348 T3

atgatctccc	tgagcccat	agtcacatgt	gtggtggtgg	atgtgagcga	ggatgaccca	3120
gatgtccaga	tcagctggtt	tgtgaacaac	gtggaagtac	acacagctca	gacacaaacc	3180
catagagagg	attacaacag	tactctccgg	gtggtcagtg	ccctcccat	ccagcaccag	3240
gactggatga	gtggcaagga	gttcaaatgc	aaggtcaaca	acaaagacct	cccagcgccc	3300
atcgagagaa	ccatctcaaa	acccaaagg	tcagtaagag	ctccacaggt	atatgtcttg	3360
cctccaccag	aagaagagat	gactaagaaa	caggtcactc	tgacctgcat	ggtcacagac	3420
ttcatgcctg	aagacattta	cgtggagtgg	accaacaacg	ggaaaacaga	gctaaactac	3480
aagaacactg	aaccagtcct	ggactctgat	ggttcttact	tcatgtacag	caagctgaga	3540
gtggaaga	agaactgggt	ggaaagaaat	agctactcct	gttcagtggt	ccacgaggg	3600
ctgcacaatc	accacacgac	taagagcttc	tcccggactc	cgggtaaatg	ataagaattc	3660
attgatcata	atcagccata	ccacatttgt	agagggttta	cttgctttaa	aaaacctccc	3720
acacctcccc	ctgaacctga	aacataaaat	gaatgcaatt	gttgttgtta	acttgtttat	3780
tgcagcttat	aatggttaca	aataaagcaa	tagcatcaca	aatttcacaa	ataaagcatt	3840
tttttactg	cattctagtt	gtggtttgtc	caaactcatc	aatgtatctt	atcatgtctg	3900
gatcctctac	gccggacgca	tcgtggccgg	catcacgggc	gccacaggtg	cggttgctgg	3960
cgcctatata	gccgacatca	ccgatgggga	agatcgggct	cgccacttcg	ggctcatgag	4020
cgtttgtttc	ggcgtgggta	tggtggcagg	ccccgtggcc	gggggactgt	tgggcgccat	4080
ctccttgcat	gcaccattcc	ttgcggcggc	ggtgctcaac	ggcctcaacc	tactactggg	4140
ctgcttccta	atgcaggagt	cgcataagg	agagcgtcga	cctcgggccg	cgttgctggc	4200
gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatacaaaa	aatcgacgct	caagtcagag	4260
gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	gctccctcgt	4320
gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggatacctg	tccgccttcc	tcccttcggg	4380
aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggtcgttcg	4440
ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctcgg	ccttatccgg	4500
taactatcgt	cttgagtcca	acccggttaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	4560
tggtaacagg	attagcagag	cagagtatgt	aggcgggtgt	acagagttct	tgaagtgggtg	4620
gcctaactac	ggctacacta	gaagaacagt	atttgggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	4680
taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccacgg	ctggtagcgg	4740
tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	4800
tttgatcttt	tctacgggg	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	aagggatttt	4860
ggtcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	4920
taaatcaatc	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	agttaccaat	gcttaatcag	4980

ES 2 696 348 T3

tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt	5040
cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc cccagtgcct caatgatacc	5100
gcgagaccca cgctcaccgg ctccagatct atcagcaata aaccagccag ccggaagggc	5160
cgagcgcaga agtgggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attggtgccg	5220
ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac	5280
aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg	5340
atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc	5400
tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggttatca ctcatggta tggcagcact	5460
gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc	5520
aaccaagtca ttctgagaat agtgtagtgc gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat	5580
acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc	5640
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac	5700
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa	5760
aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact	5820
catactcttc ttttttcaat attattgaag cttttatcag ggttattgtc tcatgagcgg	5880
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca cttttccccg	5940
aaaagtgcc cctgacgtct aagaaccat tattatcatg acattaacct ataaaaatag	6000
gcgtatcacg aggccctgat ggctctttgc ggcacccatc gttcgtaatg ttccgtggca	6060
ccgaggacaa ccctcaagag aaaatgtaat cacactggct caccttcggg tgggcctttc	6120
tgcgtttata aggagacact ttatgtttaa gaaggttggt aaattccttg cggctttggc	6180
agccaagcta gatccggctg tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag tccccaggct	6240
ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa	6300
agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa	6360
ccatagtccc gccctaact ccgcccaccc cgccttaac tccgcccagt tccgcccatt	6420
ctccgcccc tggctgacta atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct	6480
ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc	6540
tagcttgggg ccaccgctca gagcaccttc caccatggcc acctcagcaa gttcccactt	6600
gaacaaaaac atcaagcaaa tgtacttgtg cctgccccag ggtgagaaag tccaagccat	6660
gtatatctgg gttgatggta ctggagaagg actgcgctgc aaaaccgca ccctggactg	6720
tgagcccaag tgtgtagaag agttacctga gtggaatctt gatggctcta gtacctttca	6780
gtctgagggc tccaacagtg acatgtatct cagccctgtt gccatgtttc gggaccctt	6840

ES 2 696 348 T3

ccgcagagat	cccaacaagc	tggtgttctg	tgaagttttc	aagtacaacc	ggaagcctgc	6900
agagaccaat	ttaaggcact	cgtgtaaacg	gataatggac	atggtgagca	accagcacc	6960
ctggttttga	atggaacagg	agtatactct	gatgggaaca	gatgggcacc	cttttggttg	7020
gccttccaat	ggctttcctg	ggcccccaagg	tccgtattac	tgtggtgtgg	gcgcagacaa	7080
agcctatggc	agggatatcg	tggaggctca	ctaccgcgcc	tgcttgtatg	ctgggggtcaa	7140
gattacagga	acaaatgctg	aggtcatgcc	tgcccagtg	gagttccaaa	taggaccctg	7200
tgaaggaatc	cgcattgggag	atcatctctg	ggtggcccg	ttcatcttgc	atcgagtatg	7260
tgaagacttt	ggggtaatat	caacctttga	ccccaaagcc	attcctggga	actggaatgg	7320
tgcaggctgc	cataccaact	ttagcaccaa	ggccatgcgg	gaggagaatg	gtctgaagca	7380
catcgaggag	gccatcgaga	aactaagcaa	gcggcaccgg	taccacattc	gagcctacga	7440
tcccaagggg	ggcctggaca	atgccgtc	tctgactggg	ttccacgaaa	cgtccaacat	7500
caacgacttt	tctgctgggt	tgcctaactg	cagtgccagc	atccgcattc	cccgactgt	7560
cggccaggag	aagaaagggt	actttgaaga	ccgccgcccc	tctgccaat	gtgaccctt	7620
tgcaagtaca	gaagccatcg	tccgcacatg	ccttctcaat	gagactggcg	acgagccctt	7680
ccaatacaaa	aactaattag	actttgagt	atcttgagcc	tttctagt	catccaccc	7740
cgcgccagag	agatctttgt	gaaggaaact	tacttctgtg	gtgtgacata	attggacaaa	7800
ctacctacag	agatttaaag	ctctaaggta	aatataaaat	ttttaagtgt	ataatgtgtt	7860
aaactactga	ttctaattgt	ttgtgtat	tagattccaa	cctatggaac	tgatgaatgg	7920
gagcagtggt	ggaatgcctt	taatgaggaa	aacctgtttt	gctcagaaga	aatgccatct	7980
agtgatgatg	aggctactgc	tgactctcaa	cattctactc	ctccaaaaaa	gaagagaaag	8040
gtagaagacc	ccaaggactt	tccttcagaa	ttgctaagtt	ttttgagtca	tgctgtgttt	8100
agtaatagaa	ctcttgcttg	ctttgctatt	tacaccacaa	aggaaaaagc	tgcaactgcta	8160
tacaagaaaa	ttatggaaaa	atattctgta	acctttataa	gtaggcataa	cagttataat	8220
cataacatac	tgttttttct	tactccacac	aggcatagag	tgtctgctat	taataactat	8280
gctcaaaaat	tgtgtacctt	tagcttttta	atttgtaaag	gggttaataa	ggaatatttg	8340
atgtatagt	ccttgactag	agatcataat	cagccatacc	acatttgtag	aggttttact	8400
tgctttaaaa	aacctccac	acctccccct	gaacctgaaa	cataaaatga	atgcaattgt	8460
tgttgtaaac	ttgtttattg	cagcttataa	tggttacaaa	taaagcaata	gcatcacaaa	8520
tttcacaaat	aaagcatttt	tttactgca	ttctagtgt	ggtttgtcca	aactcatcaa	8580
tgtatcttat	catgtctgga	tctagcttcg	tgtcaaggac	ggtgactgca	gtgaataata	8640
aaatgtgtgt	ttgtccgaaa	tacgcgtttt	gagatttctg	tcgccgacta	aattcatgtc	8700
gcgcgatagt	ggtgtttatc	gccgatagag	atggcgatat	tggaataatc	gatatttgaa	8760

ES 2 696 348 T3

aatatggcat attgaaaatg tcgccgatgt gagtttctgt gtaactgata tcgccat	8820
ttccaaaagtg atttttgggc atacgcgata tctggcgata gcgcttatat cgtttacggg	8880
ggatggcgat agacgacttt ggtgacttgg gcgattctgt gtgtcgcaaa tatcgagtt	8940
tcgatatagg tgacagacga tatgaggcta tatcgccgat agaggcgaca tcaagctggc	9000
acatggccaa tgcataatga tctatacatt gaatcaatat tggccattag ccatattatt	9060
cattggttat atagcataaa tcaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatccata	9120
tcataaatatg tacatttata ttggctcatg tccaacatta ccgccatgtt gacattgatt	9180
attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga	9240
gttccgcgtt acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg	9300
cccatcgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg	9360
acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca	9420
tatgccaaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggccgcctt ggcattatgc	9480
ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc	9540
tattaccatg gtgatcggtt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc	9600
acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa	9660
tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc a ttgacgcaaa tgggcggtag	9720
gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgctg	9780
gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg	9840
cggccgggaa cgggtgcattg gaacgcggtt tccccgtgcc aagagtgcgc taagtaccgc	9900
ctatagagtc tataggccca cccccttggc ttcttatgca tgctatactg tttttggctt	9960
ggggtctata ccccccgct tcctcatgtt ataggtgatg gtatagctta gcctataggt	10020
gtgggttatt gaccattatt gaccactccc ctatttgtga cgatactttc cactactaat	10080
ccataacatg gctctttgcc acaactctct ttattggcta tatgccaata cactgtcctt	10140
cagagactga cacggactct gtatttttac aggatgggtt ctcatattatt atttacaat	10200
tcacatatac aacaccaccg tccccagtgc ccgcagtttt tattaaacat aacgtgggat	10260
ctccacgcga atctcgggta cgtgttccgg acatgggctc ttctccggta gcggcgagc	10320
ttctacatcc gagccctgct cccatgcctc cagcgactca tggtcgctcg gcagctcctt	10380
gctcctaaca gtggaggcca gacttaggca cagcacgatg cccaccacca ccagtgtgcc	10440
gcacaaggcc gtggcggtag ggtatgtgtc tgaaaatgag ctcggggagc gggcttgca	10500
cgctgacgca tttggaagac ttaaggcagc ggcagaagaa gatgcaggca gctgagttgt	10560
tgtgttctga taagagtcag aggttaactc cgttgcggtg ctgttaacgg tggagggcag	10620

ES 2 696 348 T3

tgtagtctga	gcagtactcg	ttgctgccgc	gcgcgccacc	agacataata	gctgacagac	10680
taacagactg	ttcctttcca	tgggtctttt	ctgcagtcac	cgtccttgac	acgaagcttg	10740
ccgccaccat	gggatggagc	tgtatcatcc	tcttcttggt	agcaacagct	acaggtgaca	10800
ttgtgctgac	ccagtctcac	aaattcatgt	ccacatcagt	aggagacagg	gtcagcatca	10860
cctgcaaggc	cagtcaggat	gtgggtactg	ctgtagcctg	gtatcaacag	aaaccagggc	10920
aatctcctaa	actactgatt	tactgggcat	ccaccgggca	cactggagtc	cctgatcgct	10980
tcacaggcag	tggatctggg	acagatttca	ctctcaccat	tagcaatgtg	cagtctgaag	11040
acttggcaga	ttatttctgt	cagcaatata	gcagctatcc	gtacacgttc	ggagggggga	11100
ccaagctgga	gctgaaacgg	cgtacgcgtg	ctgatgctgc	accaactgta	tccatcttcc	11160
caccatccag	tgagcagtta	acatctggag	gtgcctcagt	cgtgtgcttc	ttgaacaact	11220
tctaccccaa	agacatcaat	gtcaagtgga	agattgatgg	cagtgaacga	caaatggcg	11280
tcctgaacag	ttggactgat	caggacagca	aagacagcac	ctacagcatg	agcagcacc	11340
tcacgttgac	caaggacgag	tatgaacgac	ataacagcta	tacctgtgag	gccactcaca	11400
agacatcaac	ttcaccatt	gtcaagagct	tcaacaggaa	tgagtgttaa	gaattc	11456

<210> 27

<211> 11438

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> B1-secuencia de mlgG1

<400> 27

attgatcata	atcagccata	ccacatttgt	agaggtttta	cttgctttta	aaaacctccc	60
acacctcccc	ctgaacctga	aacataaaat	gaatgcaatt	gttggttgta	acttgtttat	120
tgcagcttat	aatggttaca	aataaagcaa	tagcatcaca	aatttcacaa	ataaagcatt	180
tttttactg	cattctagtt	gtggtttgtc	caaactcatc	aatgtatctt	atcatgtctg	240
gcggccgccg	atatttgaaa	atatggcata	ttgaaaatgt	cgccgatgtg	agtttctgtg	300
taactgatat	cgccattttt	ccaaaagtga	tttttgggca	tacgcgatat	ctggcgatag	360
cgcttatatc	gtttacgggg	gatggcgata	gacgactttg	gtgacttggg	cgattctgtg	420
tgtcgcaaat	atcgcagttt	cgatataggt	gacagacgat	atgaggctat	atcgccgata	480
gaggcgacat	caagctggca	catggccaat	gcatatogat	ctatacattg	aatcaatatt	540
ggccattagc	catattattc	attggttata	tagcataaat	caatattggc	tattggccat	600
tgcatacggt	gtatccatat	cataatatgt	acattttatat	tggtcatgt	ccaacattac	660
cgccatgttg	acattgatta	ttgactagtt	attaatagta	atcaattacg	gggtcattag	720
ttcatagccc	atatatggag	ttccgcgtta	cataacttac	ggtaaatggc	ccgcctggct	780

10

ES 2 696 348 T3

gaccgccc	aa	cgaccccc	gc	ccattgac	gt	gtatgttccc	atagtaacgc	840
caatagg	gac	tttccatt	ga	cgtcaat	ggg	tggagtattt	acggtaaact	900
cagtacat	ca	agtgtat	cat	atgccaa	gta	cgccccctat	tgacgtcaat	960
ggcccg	cctg	gcattat	gcc	cagtacat	ga	ccttatggga	ctttcctact	1020
tctacgt	tatt	agtcac	cgct	attaccat	gg	tgatgcggtt	ttggcagtac	1080
gtggatag	cg	gtttgact	ca	cggggatt	tc	caagtctcca	ccccattgac	1140
gtttgttt	g	gcacaaaa	at	caacggg	act	ttccaaaatg	tcgtaacaac	1200
tgacgcaa	at	ggg	cggtag	cg	gtgac	gggt	gggaggtcta	1260
tgaacc	gtca	gatcgc	cctgg	agacgc	catc	cacgctgttt	tgacctccat	1320
gggacc	gatc	cagcct	ccgc	ggccggg	aac	ggtgcattgg	aacgcggatt	1380
agagtga	cgt	aagtacc	gcc	tatagag	tct	ataggccca	ccccttggct	1440
gctatact	gt	ttttgg	cctg	gggtctata	c	acccccgctt	cctcatgtta	1500
tatagctt	ag	cctatag	gtg	tggttatt	g	accattattg	accactcccc	1560
gatacttt	cc	attactaa	tc	cataacat	gg	ctctttgcca	caactctctt	1620
atgccaa	tac	actgtc	cttc	agagact	gac	acggactctg	tatttttaca	1680
tcatttta	ta	tttacaa	att	cacatata	ca	acaccaccgt	ccccagtgcc	1740
attaaac	ata	acgtggg	atc	tccacgc	gaa	tctcgggtac	gtgttcgga	1800
tctccg	tag	cggcgg	agct	tctacat	ccg	agccctgctc	ccatgcctcc	1860
ggtcgct	cgg	cagctc	cttg	ctccta	acag	tggaggccag	acttaggcac	1920
ccaccacc	ac	cagtgt	gccg	cacaagg	ccg	tggcggtagg	gtatgtgtct	1980
tcgggg	gagc	ggcttg	cacc	gctgac	gcat	ttggaagact	taaggcagcg	2040
atgcagg	cag	ctgag	ttgtt	gtgttct	gat	aagagtcaga	ggtaactccc	2100
tgttaac	ggt	ggagg	gcagt	gtagtct	gag	cagtactcgt	tgctgccgcg	2160
gacataa	tag	ctgacag	act	aacagact	gt	tcctttccat	gggtcttttc	2220
gtccttg	aca	cgaagct	tgc	cgccacc	atg	ggatggagct	gtatcatcct	2280
gcaacag	cta	caggtga	ggt	gaagctg	gtg	gaatctggg	gaggcttagt	2340
gggtccc	gga	aactctc	ctg	tgacgc	ctct	ggattcactt	tcagtagctt	2400
tgggttc	gctc	aggctcc	aga	gaagggg	ctg	gagtggtcg	catacattag	2460
agtacc	atct	actatgc	caga	cacagtga	ag	ggccgattca	ccatctccag	2520
aagaac	accc	tgttcct	gca	aatgacc	agt	ctaaggtctg	aggacacggc	2580
tgtgca	agat	gggggt	ggac	tgggac	agga	cttgactact	ggggccaagg	2640

ES 2 696 348 T3

acagtctcct cattcgaagc caaaacgaca ccccatctg tctatccact ggcccctgga	2700
tctgctgccc aaactaactc catggtgacc ctgggatgcc tgggtcaaggg ctatttcctt	2760
gagccagtga cagtgcacct gaactctgga tccctgtcca gcggtgtgca caccttccca	2820
gctgtcctgc agtctgacct ctacactctg agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc	2880
tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacggt gccaccccg ccagcagcac caaggtggac	2940
aagaaaattg tgcccaggga ttgtggttgt aagccttgca tatgtacagt ccagaagta	3000
tcattctgtct tcattctccc cccaaagccc aaggatgtgc tcaccattac tctgactcct	3060
aaggtcacgt gtgttgtggt agacatcagc aaggatgatc ccgaggtcca gttcagctgg	3120
ttttagatg atgtggaggt gcacacagct cagacgcaac ccggggagga gcagttcaac	3180
agcactttcc gctcagtcag tgaacttccc atcatgcacc aggactggct caatggcaag	3240
gagttcaaat gcaggggtcaa cagtgcagct tccctgccc ccacgagaa aaccatctcc	3300
aaaaccaaag gcagaccgaa ggctccacag gtgtacacca ttccacctcc caaggagcag	3360
atggccaagg ataaagtcag tctgacctgc atgataacag acttcttccc tgaagacatt	3420
actgtggagt ggcagtgga tgggcagcca gcggagaact acaagaacac tcagcccatc	3480
atggacacag atggctctta cttcgtctac agcaagctca atgtgcagaa gagcaactgg	3540
gaggcaggaa atactttcac ctgctctgtg ttacatgagg gcctgcacaa ccaccatact	3600
gagaagagcc tctccactc tcctggtaaa tgagaattca ttgatcataa tcagccatac	3660
cacatttgta gaggttttac ttgctttaa aaacctccc cacctcccc tgaacctgaa	3720
acataaaatg aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia	3780
ataaaacaat agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagtgt	3840
tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcattgtctg atcctctacg ccggacgcat	3900
cgtggccggc atcacccggc ccacaggtgc ggttgcctgc gcctatatcg ccgacatcac	3960
cgatggggaa gatcgggctc gccacttcgg gctcatgagc gcttgtttcg gcgtgggtat	4020
ggtggcaggc cccgtggccg ggggactgtt gggcgccatc tccttgcctg caccattcct	4080
tgcgggggcg gtgctcaacg gcctcaacct actactgggc tgcttcctaa tgcaggagtc	4140
gcataaggga gagcgtcgac ctcgggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc	4200
ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact	4260
ataaaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgetctcctg ttccgaccct	4320
gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct ccttcggga agcgtggcgc tttctcatag	4380
ctcacgctgt aggtatctca gttcgtgtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca	4440
cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa	4500
cccggtgaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc	4560

ES 2 696 348 T3

gaggtatgta ggcgggtgcta cagagtttctt gaagtgggtgg cctaactacg gctacactag	4620
aagaacagta tttgggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg	4680
tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca	4740
gcagattacg cgcagaaaaa aggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc	4800
tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag	4860
gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata	4920
tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat	4980
ctgtctatctt cggtcatcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg	5040
ggagggctta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc	5100
tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggtcctgc	5160
aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc	5220
gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc	5280
gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg tccccacga tcaaggcgag ttacatgatc	5340
ccccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc ctccggctct ccgatcgttg tcagaagtaa	5400
gttgccgcga gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat	5460
gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata	5520
gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca	5580
tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag	5640
gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc	5700
agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc	5760
aaaaaagga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata	5820
ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta	5880
gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta	5940
agaaaccatt attatcatga cattaacctt taaaaatagg cgtatcacga ggccctgatg	6000
gctctttgcg gcacccatcg ttcgtaatgt tccgtggcac cgaggacaac cctcaagaga	6060
aatgtaatc acactggctc accttcgggt gggcctttct gcgtttataa ggagacactt	6120
tatgtttaag aaggttgga aattccttgc ggctttggca gccaagctag atccggtgt	6180
ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt cccaggtct cccagcaggc agaagtatgc	6240
aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag	6300
gcagaagtat gcaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc	6360
cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa	6420

ES 2 696 348 T3

ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctatcc cagaagtagt	6480
gaggaggcctt ttttgaggcc ctaggccttt gcaaaaagct agcttggggc caccgctcag	6540
agcaccttcc accatggcca cctcagcaag ttcccacttg aacaaaaaca tcaagcaaat	6600
gtactttgtgc ctgccccagg gtgagaaagt ccaagccatg tatatctggg ttgatggtac	6660
tggagaagga ctgcgctgca aaaccgcac cctggactgt gagcccaagt gtgtagaaga	6720
gttacctgag tggaatcttg atggctctag tacctttcag tctgagggtc ccaacagtga	6780
catgtatctc agccctgttg ccatgtttcg ggacccttc cgcagagatc ccaacaagct	6840
ggtgttctgt gaagtcttca agtacaaccg gaagcctgca gagaccaatt taaggcactc	6900
gtgtaaacgg ataattggaca tgggtagcaa ccagcaccgc tggttttgaa tggaacagga	6960
gtatactctg atgggaacag atgggcaccc ttttggttgg ccttccaatg gctttcctgg	7020
gccccaaagt ccgtattact gtggtgtggg cgcagacaaa gcctatggca gggatatcgt	7080
ggaggctcac taccgcgcct gcttgtatgc tggggctcaag attacaggaa caaatgctga	7140
ggtcatgcct gccagtgagg agttccaaat aggaccctgt gaaggaatcc gcatgggaga	7200
tcatctctgg gtggcccggt tcatcttgca tcgagtatgt gaagactttg gggtaatagc	7260
aacctttgac cccaagccca ttcttgaggaa ctggaatggt gcaggctgcc ataccaactt	7320
tagcaccaag gccatgcggg aggagaatgg tctgaagcac atcgaggagg ccatcgagaa	7380
actaagcaag cggcaccggg accacattcg agcctacgat cccaaggggg gcctggacaa	7440
tgcccgtcgt ctgactgggt tccacgaaac gtccaacatc aacgactttt ctgctggtgt	7500
cgccaatcgc agtgccagca tccgcattcc ccggactgtc ggccaggaga agaaaggtta	7560
ctttgaagac cgcgcgccct ctgccaatg tgaccctttt gcagtgcagc aagccatcgt	7620
ccgcacatgc cttctcaatg agactggcga cgagcccttc caatacaaaa actaattaga	7680
ctttgagtga tcttgagcct ttcttagttc atcccacccc gcccagaga gatctttgtg	7740
aaggaacctt acttctgtgg tgtgacataa ttggacaaac tacctacaga gatttaaagc	7800
tctaaggtaa atataaaatt ttttaagtga taatgtgtta aactactgat tctaattgtt	7860
tgtgtatctt agattccaac ctatggaact gatgaatggg agcagtgggt gaatgccttt	7920
aatgaggaaa acctgttttg ctcagaagaa atgccatcta gtgatgatga ggctactgct	7980
gactctcaac attctactcc tccaaaaaag aagagaaagg tagaagaccg caaggacttt	8040
ccttcagaat tgctaagttt tttgagtcat gctgtgttta gtaatagaac tcttgcttgc	8100
tttgctatct acaccacaaa ggaaaaagct gcactgctat acaagaaaaa tatggaaaaa	8160
tattctgtaa cctttataag taggcataac agttataatc ataacatact gttttttctt	8220
actccacaca ggcataaggt gtctgctatt aataactatg ctcaaaaatt gtgtaccttt	8280
agctttttta tttgtaaagg ggttaataag gaatatctga tgtatagtgc cttgactaga	8340

ES 2 696 348 T3

gatcataatc agccatacca catttgtaga ggttttactt gcttttaaaa acctcccaca	8400
cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattggt gttgttaact tgtttattgc	8460
agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt	8520
ttcactgcat tctagtgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatac atgtctggat	8580
ctagcttcgt gtcaaggacg gtgactgcag tgaataataa aatgtgtgtt tgtccgaaat	8640
acgcgttttg agatttctgt cgccgactaa attcatgtcg cgcgatagtg gtgtttatcg	8700
ccgatagaga tggcgatatt ggaaaaatcg atatttgaaa atatggcata ttgaaaatgt	8760
cgccgatgtg agtttctgtg taactgatata cgccattttt ccaaaagtga tttttgggca	8820
tacgcgatata ctggcgatag cgcttatatac gtttacgggg gatggcgata gacgactttg	8880
gtgacttggg cgattctgtg tgtcgcaaat atcgagttt cgatataggt gacagacgat	8940
atgaggctat atcgccgata gaggcgacat caagctggca catggccaat gcataatcgat	9000
ctatacattg aatcaatatt ggccattagc catattattc attggttata tagcataaat	9060
caatattggc tattggccat tgcatacgtt gtatccatat cataatatgt acatttatat	9120
tggctcatgt ccaacattac cgccatgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta	9180
atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac	9240
ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac	9300
gtatgttccc atagtaacgc caataggacg tttccattga cgtcaatggg tggagtattt	9360
acggtaaact gccacttg cagtacatca agtgtatcat atgccaaagta cgccccctat	9420
tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga	9480
ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt	9540
ttggcagtag atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca	9600
ccccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacccaaaat caacgggact ttccaaaatg	9660
tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaata gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta	9720
tataagcaga gctcgtttag tgaaccgtca gatcgctgg agacgccatc cacgctgttt	9780
tgacctccat agaagacacc gggaccgatc cagcctccgc ggccgggaac ggtgcattgg	9840
aacgcggatt ccccggtcca agagtacgt aagtaccgcc tatagagtct ataggccac	9900
ccccttggct tcttatgcat gctatactgt ttttggttg gggctctatac acccccgtt	9960
cctcatgtta taggtgatgg tatagcttag cctataggtg tgggttattg accattattg	10020
accactcccc tattggtgac gatactttcc attactaatc cataacatgg ctctttgcca	10080
caactctctt tattggctat atgccaatc actgtccttc agagactgac acggactctg	10140
tatttttaca ggatggggtc tcatttatta tttacaaat cacatatata acaccaccgt	10200

ES 2 696 348 T3

```

ccccagtgcc cgcagttttt attaaacata acgtgggatc tccacgcgaa tctcgggtac 10260
gtgttccgga catgggctct tctccggtag cggcggagct tctacatccg agccctgctc 10320
ccatgcctcc agcgactcat ggtcgctcgg cagctccttg ctctaacag tggaggccag 10380
acttaggcac agcacgatgc ccaccaccac cagtgtgccg cacaaggccg tggcggtagg 10440
gtatgtgtct gaaaatgagc tcggggagcg ggcttgacc gctgacgcat ttggaagact 10500
taaggcagcg gcagaagaag atgcaggcag ctgagttggt gtgttctgat aagagtcaga 10560
ggtaactccc gttgcgggtgc tgtaaacggt ggagggcagt gtagtctgag cagtactcgt 10620
tgctgccgcg cgcgccacca gacataatag ctgacagact aacagactgt tcctttccat 10680
gggtcttttc tgcagtcacc gtccttgaca cgaagcttgc cgccaccatg ggatggagct 10740
gtatcatcct cttcttggtg gcaacagcta cagtgatat tgtgctaact cagtctccag 10800
cactcatggc tgcattctca ggggagaagg tcaccatcac ctgcagtgtc agctcaagta 10860
taagttccag caacttgac tggtaccagc agaagtcaga aacctcccc aaacctgga 10920
tttatggcac atccaacctg gcttctggag tcctgttcg cttcagtggc agtggatctg 10980
ggacctctta ttctctcaca atcagcagca tggaggctga agatgctgcc acttattact 11040
gtcaacagtg gagtagttac ccattcacgt tcggctcggg gaccaagctg gaaataaaac 11100
ggcgtagcgg tgctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc agtgagcagt 11160
taacatctgg aggtgcctca gtcgtgtgct tcttgaacaa cttctacccc aaagacatca 11220
atgtcaagtg gaagattgat ggcagtgaac gacaaaatgg cgtcctgaac agttggactg 11280
atcaggacag caaagacagc acctacagca tgagcagcac cctcacgttg accaaggacg 11340
agtatgaacg acataacagc tatacctgtg aggccactca caagacatca acttcaccca 11400
ttgtcaagag cttcaacagg aatgagtgtt aagaattc 11438

```

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 28

ttgtccgtt tgtcaagag 20

10 <210> 29

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 29

cggaataaac tgtgtcact g 21

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que comprende:
regiones determinantes de complementariedad como se expone en las SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5 y NO: 6 (B4), o
- 5 regiones determinantes de complementariedad como se expone en las SEQ ID NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11 y NO: 12 (B1),
en donde el anticuerpo se une específicamente a CD84.
2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1,
que disminuye la actividad antiapoptótica de las células de estroma en las células de leucemia linfocítica crónica (CLL); o
- 10 que inhibe la secreción de CCL3 procedente de células de CLL; o
que inhibe la expresión de BCL-2 en CLL; o
que inhibe la expresión de BCL-2 de estroma; o
que reduce la expresión de IL-6 e IL-8 en células de estroma; o
- 15 que produce movilización de células de CLL de la médula ósea.
3. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que es una IgG.
4. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo híbrido.
5. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo
- 20 biespecífico.
6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
7. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en provocar apoptosis en linfocitos B de un sujeto que tiene neoplasia de linfocitos B.
- 25 8. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento de una neoplasia de linfocitos B en un sujeto que la necesita.
9. La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo para el uso de la reivindicación 7 u 8, en donde dicha neoplasia de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en un linfoma, una leucemia y un mieloma.
10. Un método de diagnóstico de B-CLL en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método:
- 30 (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en condiciones que permitan la formación de inmunocomplejos entre la isoforma C de CD84 (SEQ ID NO: 14) y el anticuerpo; y
- (b) determinar una concentración de los inmunocomplejos en dicha muestra biológica, en donde un aumento en el nivel de dichos inmunocomplejos más allá de un umbral predeterminado con respecto a la concentración de dichos
- 35 inmunocomplejos en una muestra biológica de un individuo sano es indicativo de la B-CLL.
11. El método de la reivindicación 10, que comprende además corroborar el diagnóstico utilizando un análisis de diagnóstico seleccionado de la expresión del marcador de superficie distintiva de dicha isoforma c de CD84, análisis de cariotipo y mutaciones de la estirpe germinativa.
12. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una
- 40 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
13. El polinucleótido aislado de la reivindicación 12 como se expone en la SEQ. ID. NO: 26 o NO: 27.

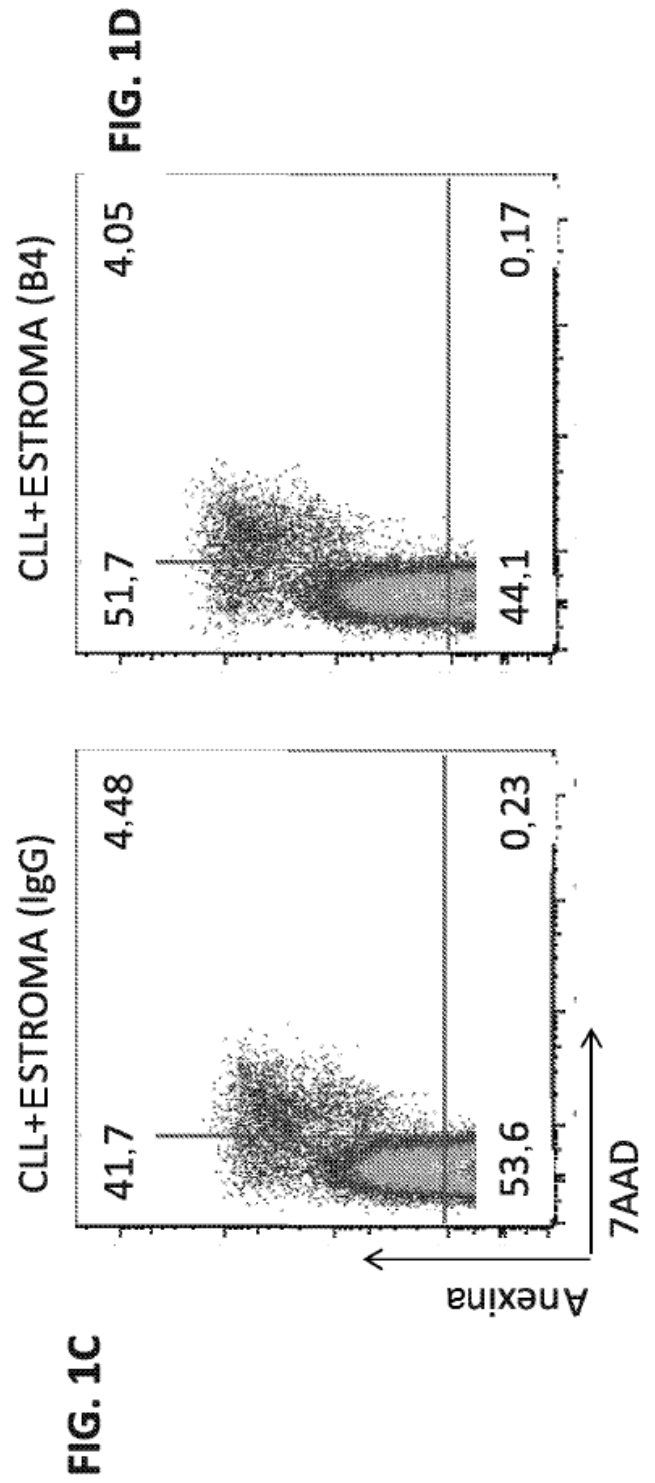
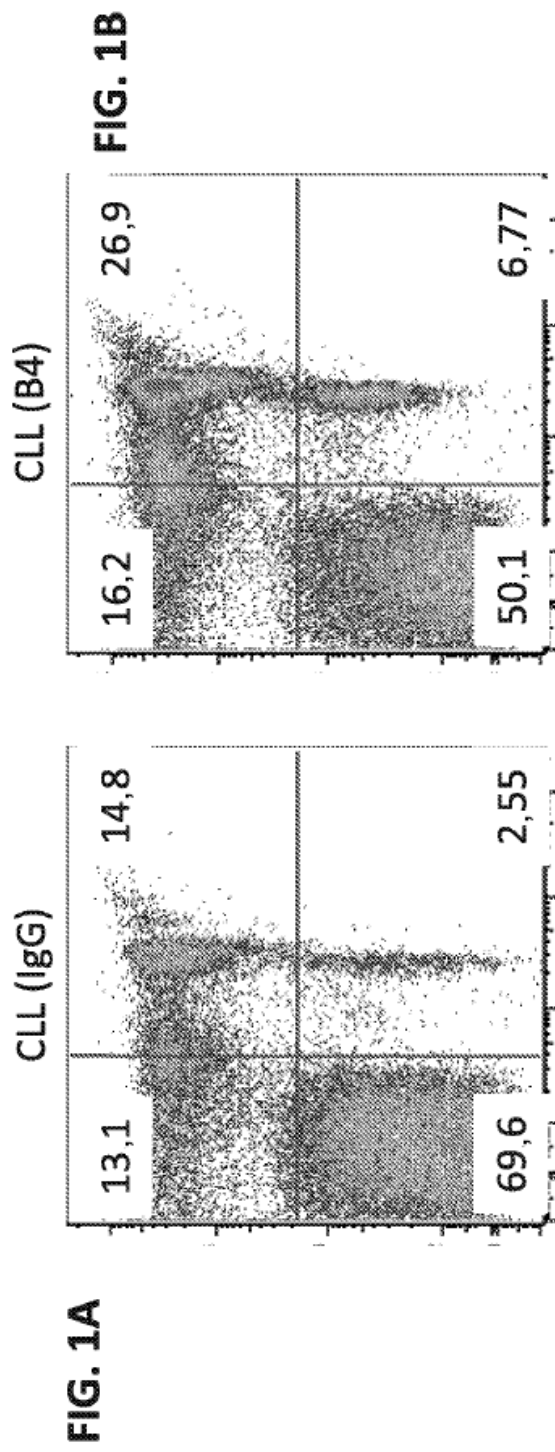


FIG. 2A

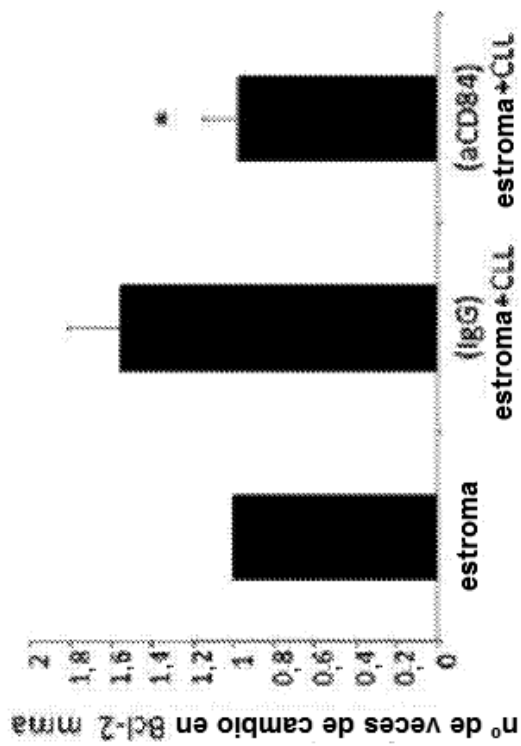


FIG. 2B

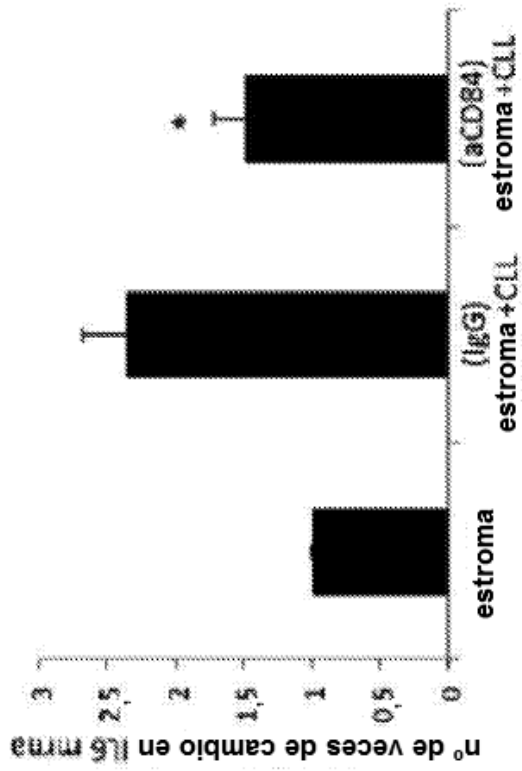
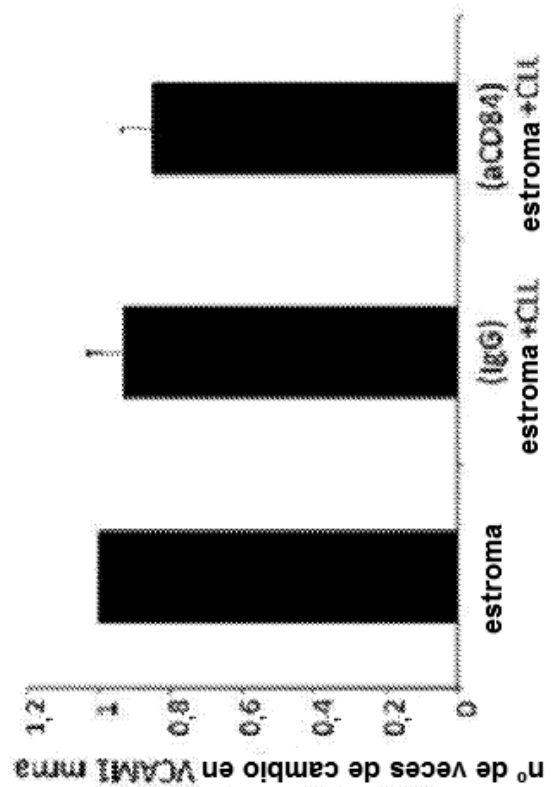


FIG. 2C



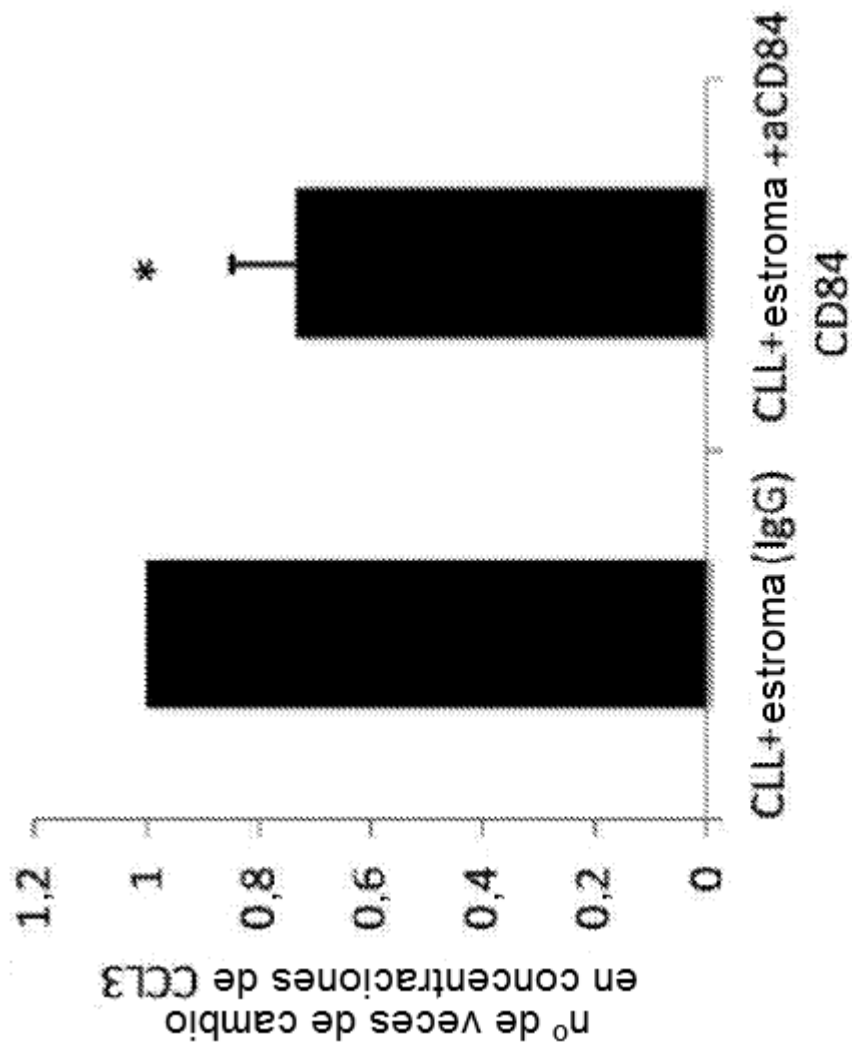
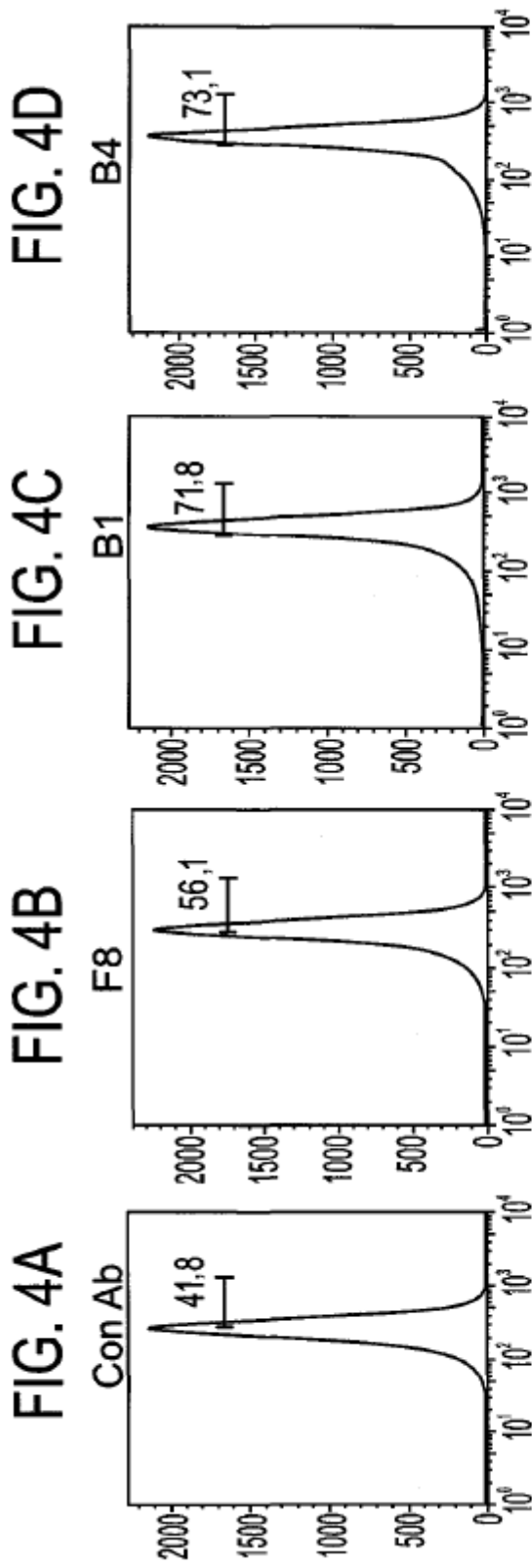
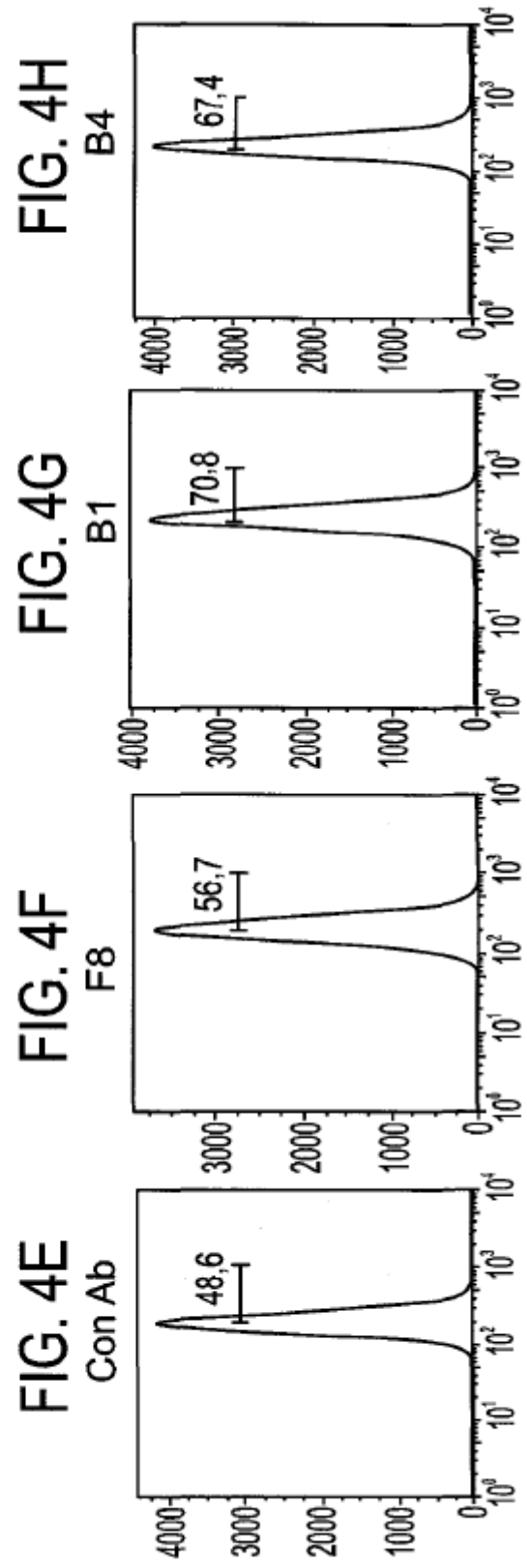


FIG. 3



→
Magic Red



→
Magic Red

FIG. 5B

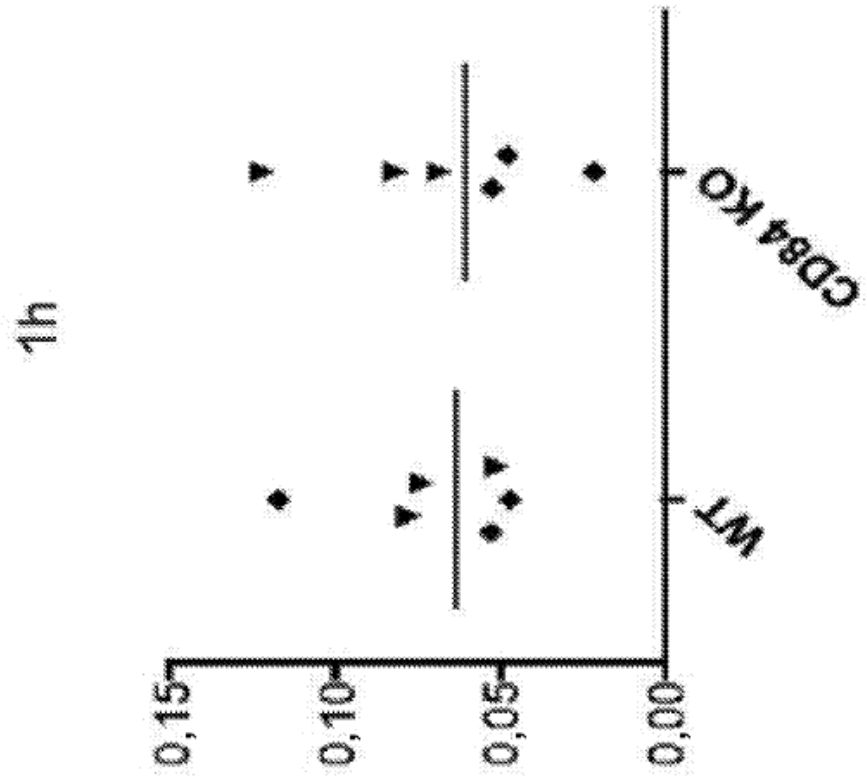


FIG. 5A

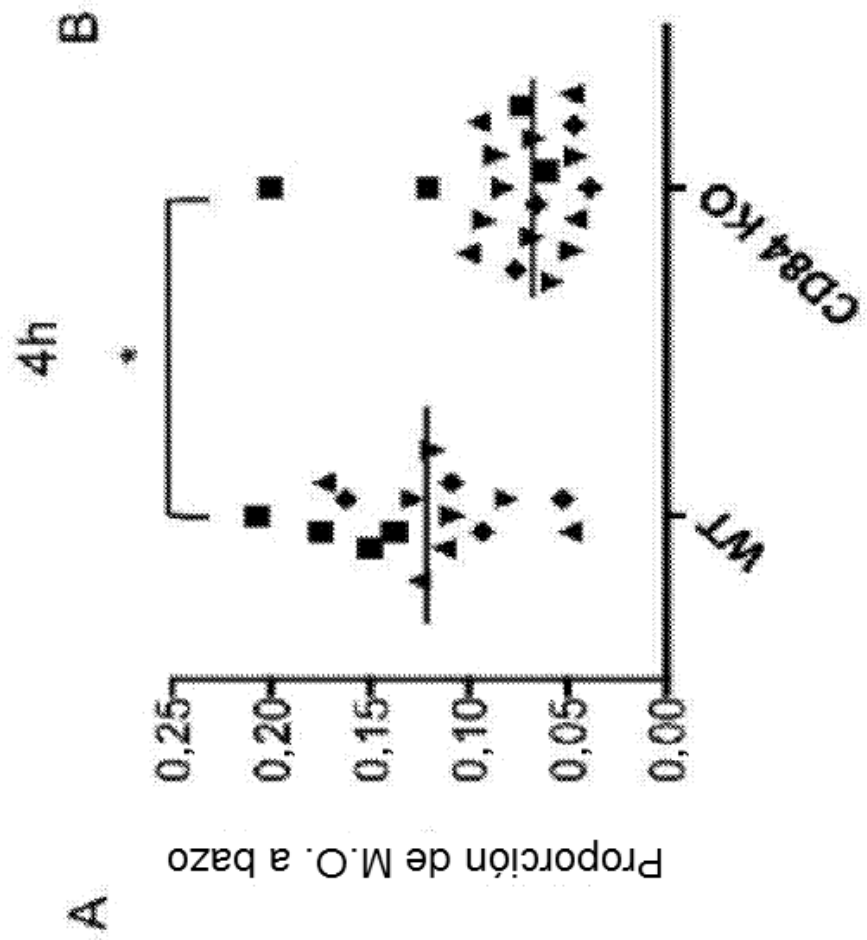


FIG. 6A

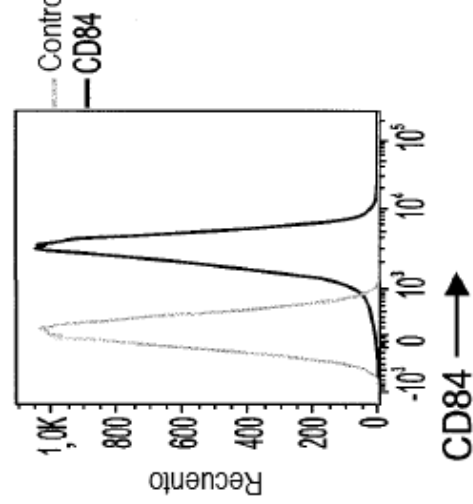


FIG. 6B

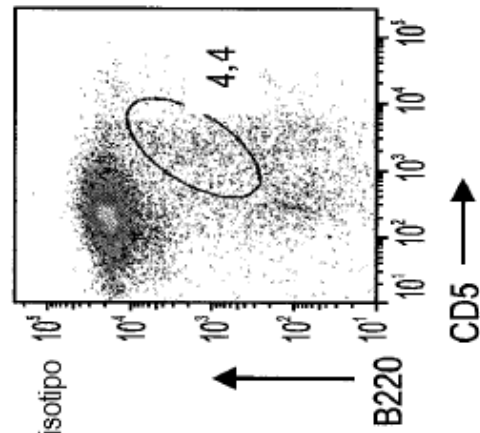


FIG. 6C

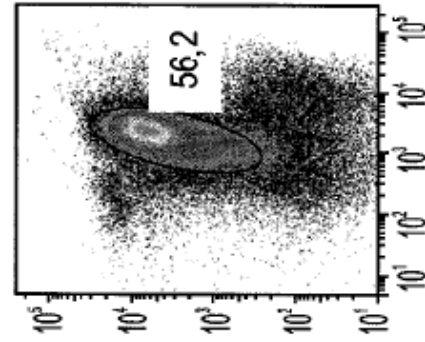
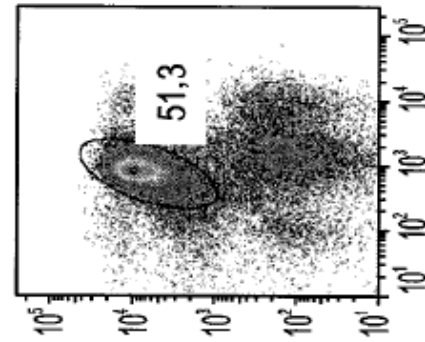


FIG. 6D



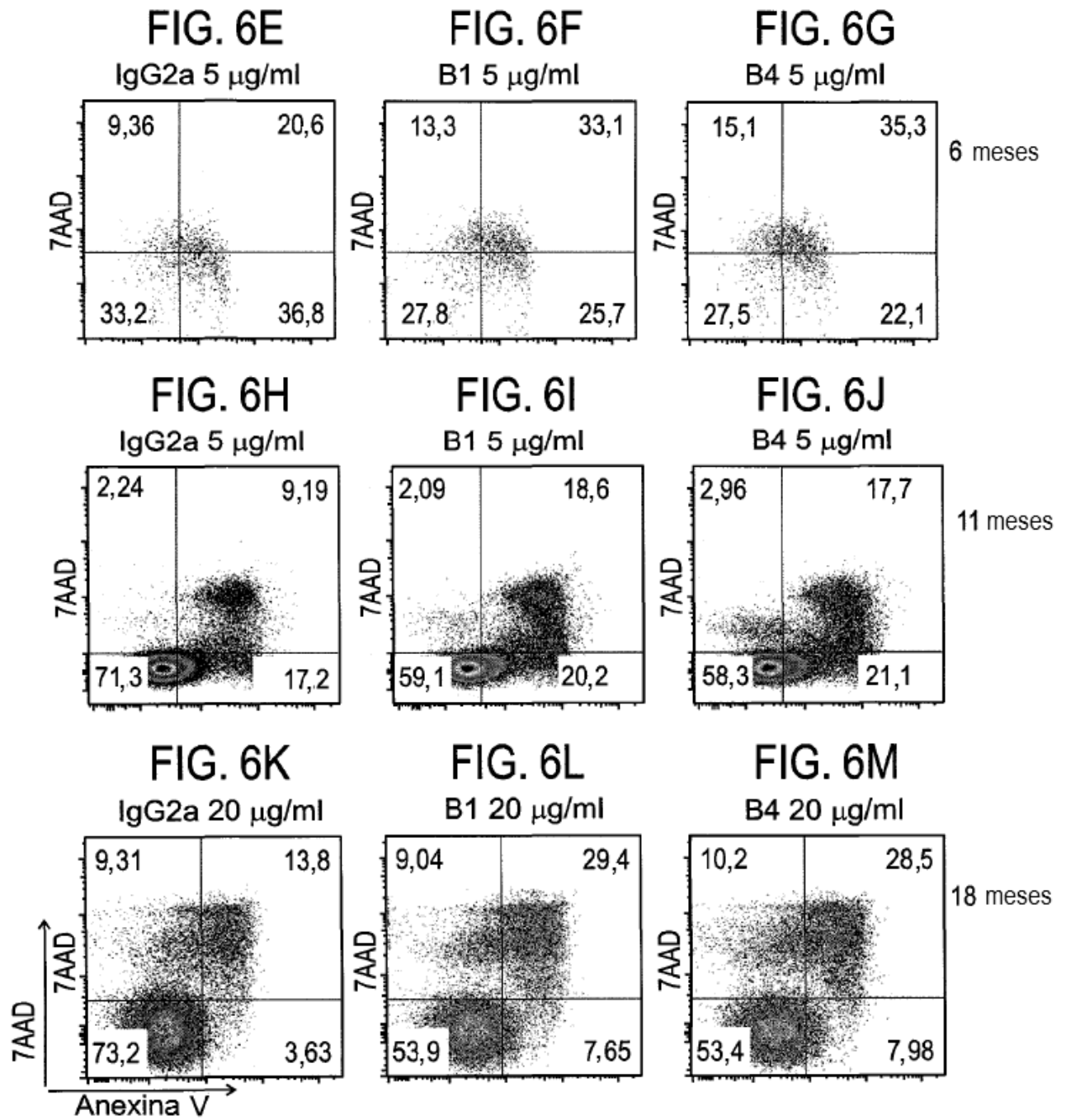


FIG. 7A

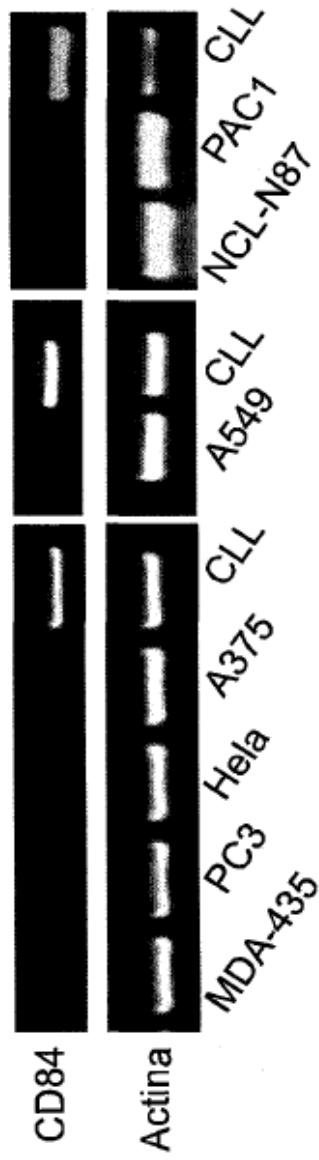


FIG. 7B

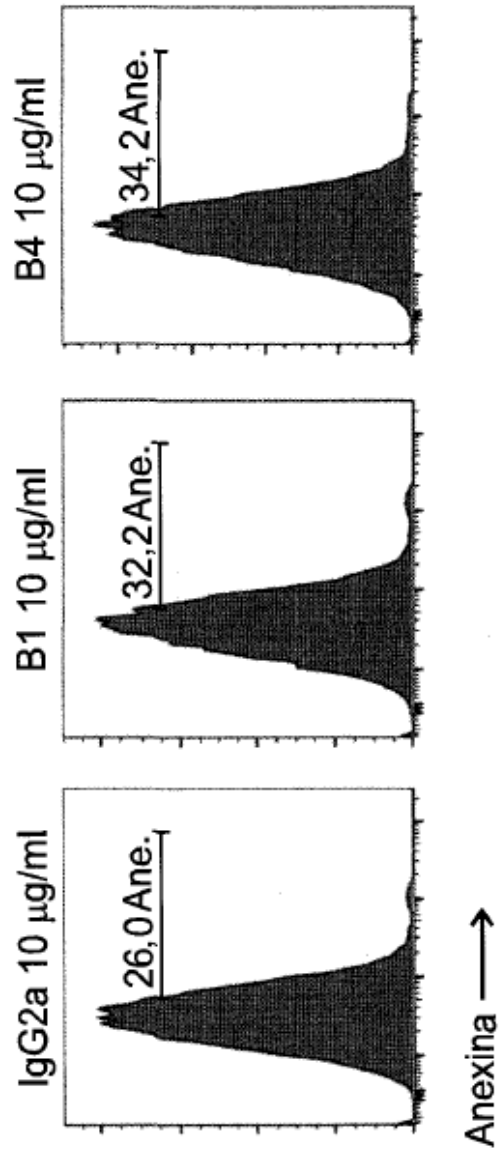
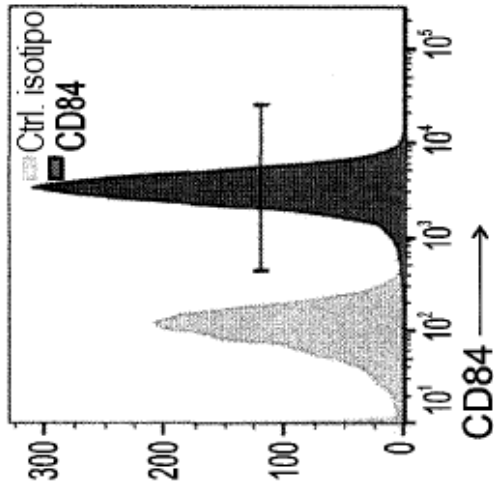


FIG. 7C

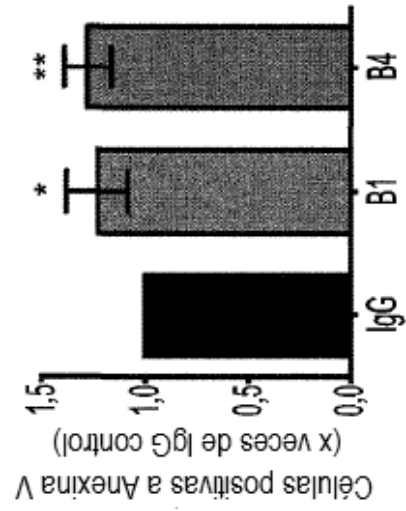


FIG. 7D

FIG. 8A

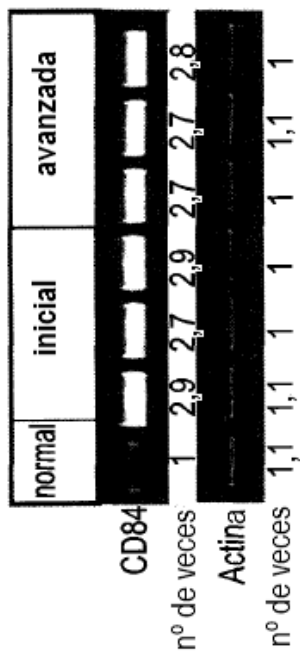


FIG. 8B

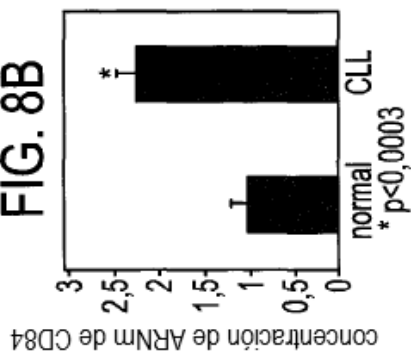


FIG. 8C

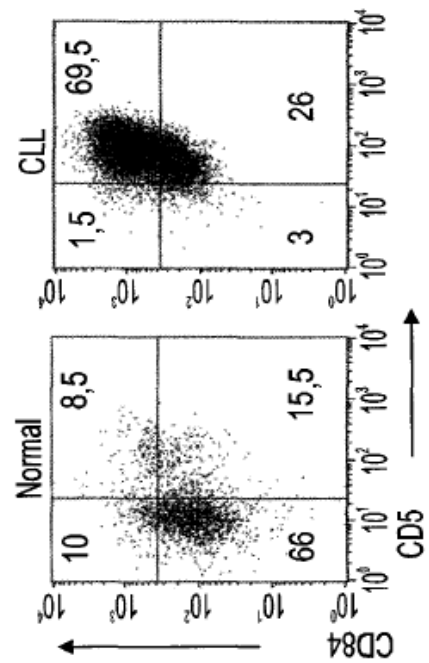
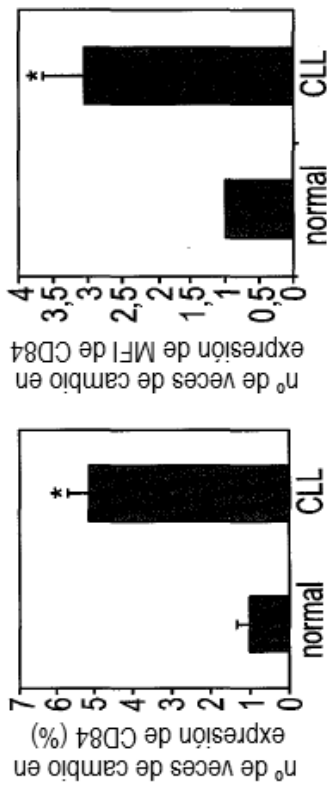
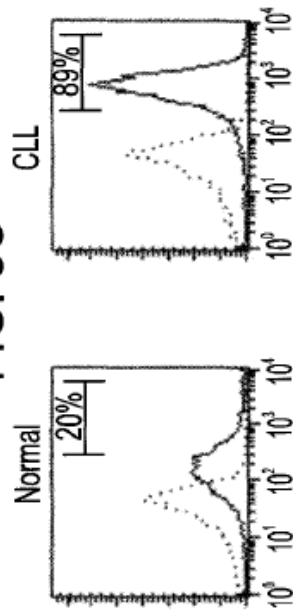


FIG. 8F

FIG. 8D

* $p < 0,000002$

FIG. 8E

* $p < 0,0000028$

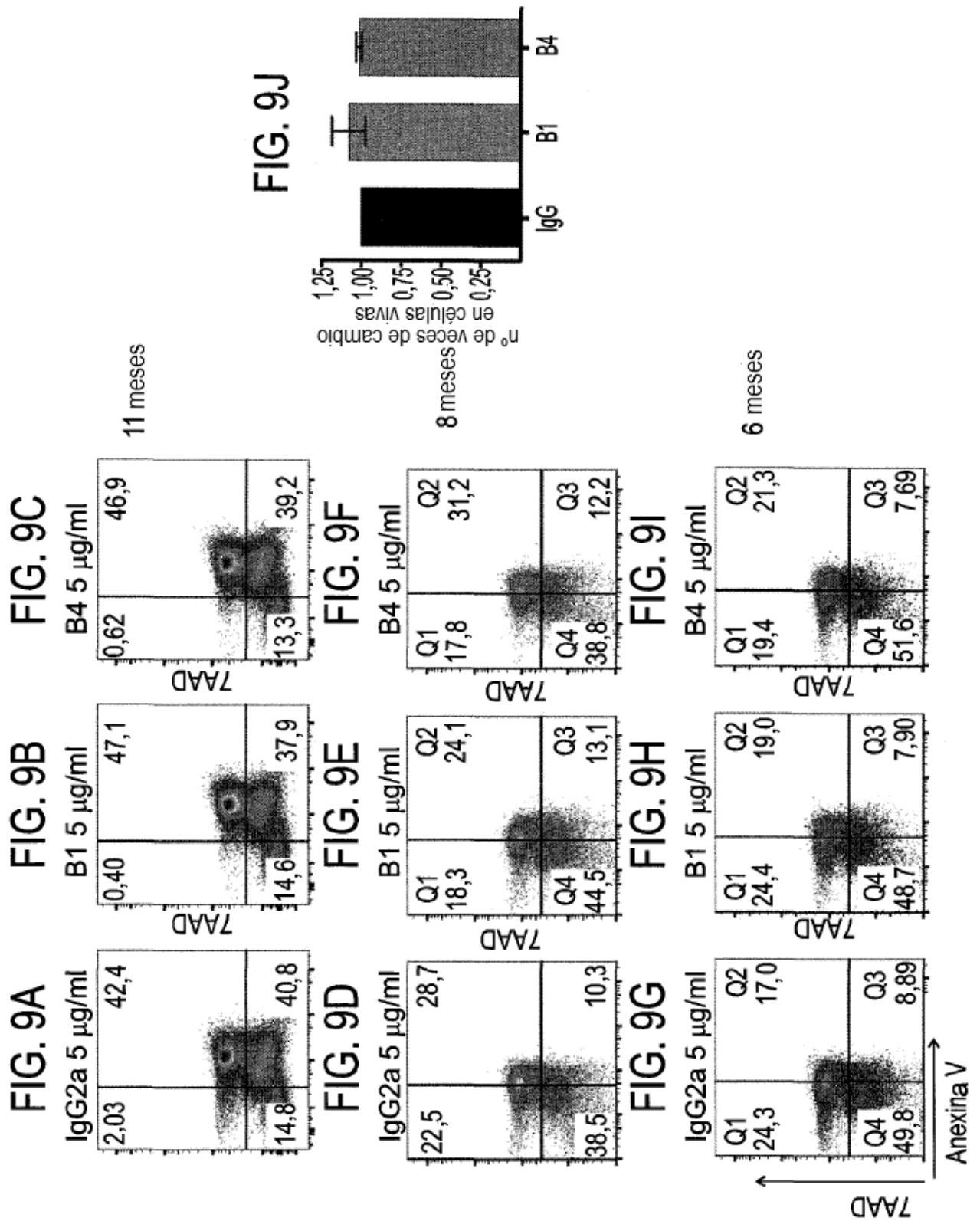


FIG. 10A

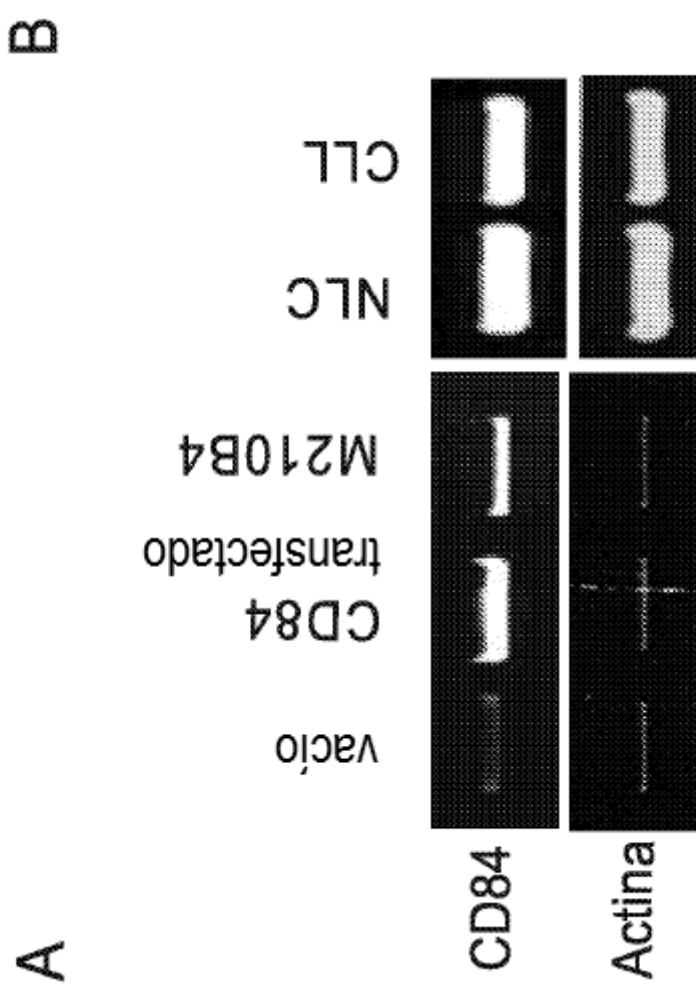


FIG. 10B

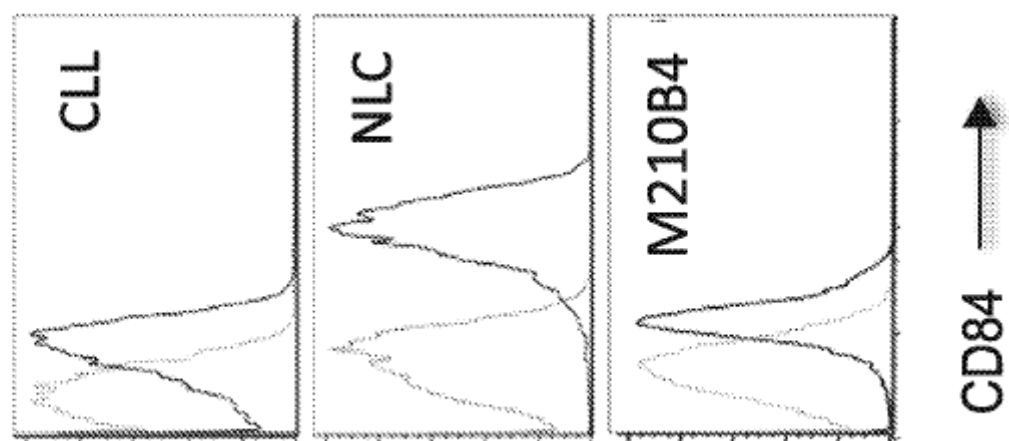


FIG. 11A

CLL

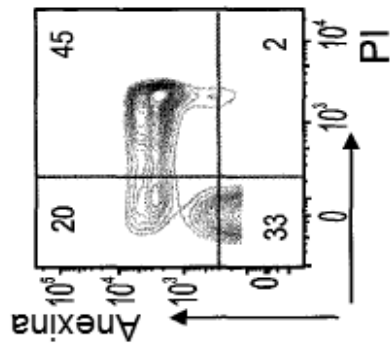


FIG. 11B

CLL+ESTROMA

(IgG)

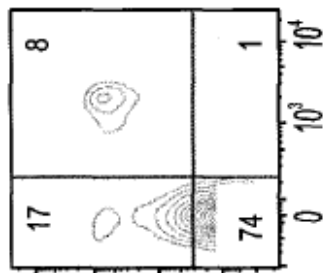
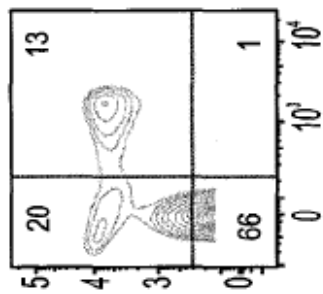


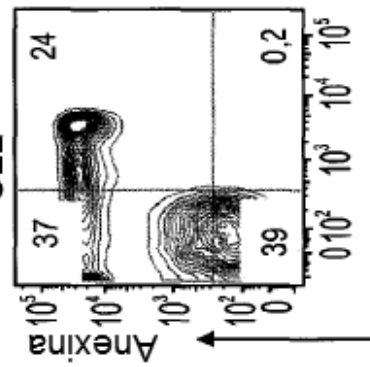
FIG. 11C

CLL+ESTROMA

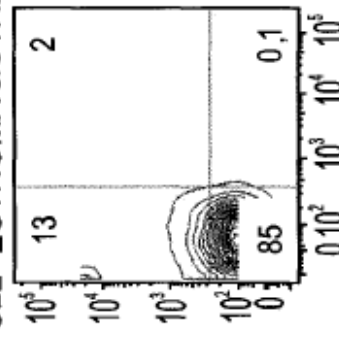
(aCD84-B4)



CLL



CLL+ESTROMA siCTRL



CLL+ESTROMA siCD84

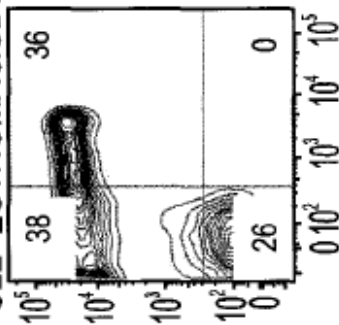


FIG. 11D

FIG. 11E

FIG. 11F

FIG. 11G

