

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 057**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/NL2014/050873**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15093949**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14825462 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3083678**

54 Título: **Medios y métodos para contrarrestar trastornos mieloproliferativos o linfoproliferativos**

30 Prioridad:

17.12.2013 EP 13197882

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2019

73 Titular/es:

**AIMM THERAPEUTICS B.V. (100.0%)
Meibergdreef 59
1105 BA Amsterdam Zuidoost, NL**

72 Inventor/es:

**SPITS, HERGEN;
BEAUMONT, TIM;
GILLISSEN, MARIJN ALETTA;
BAKKER, ADRIANUS QUIRINUS;
HAZENBERG, METTE DEBORAH y
KEDDE, MARTIJN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkingen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 729 057 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

Medios y métodos para contrarrestar trastornos mieloproliferativos o linfoproliferativos

5 La invención se refiere a los campos de la biología, inmunología, medicina y terapia del cáncer, en particular la terapia contra trastornos mieloproliferativos o linfoproliferativos. Más en particular, la invención se refiere a anticuerpos contra las células de leucemia mieloide aguda.

10 La leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés) es una neoplasia maligna de riesgo alto con tasas de supervivencia a cinco años de 40 - 50 % en pacientes menores de 60 años edad. Para los pacientes mayores de 65 años de edad, los resultados son aún peores, solo menos del 20 % de los pacientes obtienen remisiones duraderas. El trasplante alogénico de células madre se aplica con frecuencia en el tratamiento de la leucemia aguda. Se diseñó inicialmente para rescatar a los pacientes de la quimioterapia mieloablativa que de cualquier otra manera sería letal, pero se encontró posteriormente que se complicaba debido a las complicaciones relacionadas con la respuesta inmunitaria alorreactiva (enfermedad de injerto contra huésped; GvHD, por sus siglas en inglés). La depleción de las células T de los injertos antes de la reinfusión evitó la GvHD, pero la observación de que los receptores de injertos depletados de células T, similar a los receptores de trasplantes de donantes gemelos monocigóticos, experimentaron tasas mucho más altas de recaída, dejó cada vez más claro que el éxito del SCT alogénico depende de la inducción de una respuesta inmunitaria contra la leucemia (injerto contra leucemia (GvL, por sus siglas en inglés)). Esto ha llevado al desarrollo de estrategias para aplicar el trasplante alogénico de células madre sin condicionamiento mieloablativo (trasplante de células madre de intensidad reducida, RIST, por sus siglas en inglés), para reducir la citotoxicidad y permitir el SCT alogénico en un grupo más grande de pacientes, lo que incluye pacientes de edad avanzada y pacientes altamente pretratados. Los regímenes de preparación en el RIST se dirigen a diezmar el sistema inmunitario adaptativo de los receptores para prevenir el rechazo del injerto, sin la ablación completa de la médula ósea del receptor, lo que reduce de esta manera la toxicidad temprana del SCT. Después del trasplante, las células madre del donante reemplazan gradualmente a las células madre del receptor y se logra usualmente el quimerismo completo del donante dentro de los tres meses posteriores al SCT. Si bien el SCT alogénico es curativo en un número significativo de pacientes, y se ha progresado mucho en el cuidado de apoyo de los receptores del SCT, aún el 15-30 % de los pacientes muere como resultado de complicaciones relacionadas con el trasplante, tales como la GvHD y las complicaciones infecciosas (que surgen como resultado de una recuperación inmunitaria lenta después del SCT o como una complicación de la terapia inmunosupresora de la GvHD).

35 Por lo tanto, aunque el SCT es potencialmente curativo cuando se inducen respuestas potentes de injerto contra leucemia (GvL), su éxito terapéutico se limita por las respuestas inmunitarias contra el huésped que conducen a la GvHD, que causa una alta morbilidad y mortalidad.

40 Aproximadamente el 70 % de los pacientes con SCT desarrollan GvHD en un momento posterior al SCT, con órganos objetivo que incluyen la piel, el hígado, el intestino y los pulmones. La GvHD se trata con terapia inmunosupresora local o sistémica, lo que incluye corticosteroides. Un número significativo de pacientes con GvHD no responde a la terapia con esteroides, y aproximadamente la mitad de estos pacientes responden además pobremente a medidas alternativas (y en parte aún experimentales) tales como el trasplante de células mesenquimales estromales (MSC, por sus siglas en inglés) o la terapia de modulación de células T tal como el anti-factor de necrosis tumoral α (anti-TNF α ; infliximab). La terapia inmunosupresora extensa y a largo plazo es indeseable, ya que puede obstaculizar el desarrollo de respuestas terapéuticas contra la leucemia. De hecho, cuando se produce una recaída en AML mientras el paciente aún está en terapia inmunosupresora, la primera etapa es reducir rápidamente los inmunosupresores. Esto puede inducir una respuesta GvL curativa, a menudo a expensas de la GvHD. En pacientes con recaída en terapia inmunosupresora que no responden a la reducción gradual de los inmunosupresores o pacientes en recaída en los que los inmunosupresores ya se habían discontinuado por etapas antes de que se produjera la recaída, pero que no habían desarrollado GvHD, la reducción de la carga tumoral mediante quimioterapia, seguida de dosis crecientes de infusiones de linfocitos del donante (DLI, por sus siglas en inglés) puede conducir a una remisión duradera de la enfermedad. Si bien la ausencia de pruebas de diagnóstico para demostrar la presencia de una respuesta GvL robusta hace difícil estimar exactamente cuán a menudo el SCT alogénico induce respuestas de GvL en la AML primaria o en recaída, algunos estudios proporcionaron evidencia convincente de la inducción de dicha respuesta en un número considerable de pacientes. Por ejemplo, Schmid y sus colegas demostraron respuestas GvL potentes mediante DLI en el 50 % de un grupo pequeño de pacientes con AML con recaída de la enfermedad que estaban en segunda remisión después de la quimioterapia (Schmid y otros, 2007). Schlenk y sus colegas demostraron convincentemente el valor aditivo del SCT alogénico en la AML primaria, con una duplicación de la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años en pacientes con AML de riesgo alto que recibieron un SCT alogénico de un hermano, en comparación con los pacientes que no tenían un donante hermano adecuado (Schlenk y otros, 2008). Por lo tanto, las respuestas GvL se producen a menudo a costa de la GvHD, y la observación de que la depleción de las células T del injerto redujo la incidencia de la GvHD, pero aumentó las tasas de recaída de la enfermedad, sugirió que ambas se median principalmente por las respuestas inmunitarias dependientes de células T contra los antígenos del receptor.

65 En vista de la incidencia alta de la GvHD después del trasplante alogénico de células madre, lo que da como resultado la muerte del 15-30 % de los pacientes, así como también el hecho de que no siempre hay un donante adecuado disponible para un paciente determinado, se necesitan enfoques de tratamiento alternativos. Es un objeto de la presente invención proporcionar medios y métodos alternativos para contrarrestar y/o prevenir la AML.

La presente invención se refiere a anticuerpos humanos, específicos para la AML, derivados de pacientes, que pueden unirse a células de AML intactas. Se proporciona un anticuerpo humano aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este, que puede unirse al snRNP200 de células de leucemia mieloide aguda (AML) y que puede disminuir la proliferación de células de AML por oncosis. Además, se proporciona un anticuerpo aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este, capaz de unirse al snRNP200 de las células de AML y disminuir la proliferación de las células de AML, que comprende una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se define en la reivindicación 2. Es importante destacar que los anticuerpos se derivan de pacientes humanos con AML que recibieron un SCT alogénico y están en remisión completa, lo que indica que los anticuerpos son eficaces contra la AML. De hecho, en los Ejemplos se ha demostrado que los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden unirse a células de AML intactas. Los anticuerpos humanos específicos para la AML de acuerdo con la presente invención son, por lo tanto, adecuados particularmente para su uso en la terapia contra la AML. Por ejemplo, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención con un resto tóxico. Después de la administración, las células de AML se unirán y/o se internalizarán y el resto tóxico ejercerá su efecto tóxico en la célula de la AML. Alternativamente, en algunas modalidades, se induce citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés) mediante el uso de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, unido opcionalmente a un compuesto inmunomodulador. El hecho de que se proporcionen anticuerpos humanos, o partes funcionales o equivalentes funcionales de anticuerpos humanos, disminuye la posibilidad de efectos secundarios en los seres humanos, lo cual es una ventaja importante. Por lo tanto, con los anticuerpos proporcionados por la presente invención, se dispone de nuevas opciones de tratamiento de la AML que pueden usarse además de la terapia para la AML existente, o como una alternativa.

Una modalidad importante de la presente invención proporciona anticuerpos humanos específicos para la AML que son capaces de disminuir la proliferación de células de AML. La administración de dichos anticuerpos a un paciente con AML contrarrestará las células de AML sin la necesidad de agregar restos (tóxicos) adicionales al anticuerpo. Una modalidad preferida particularmente proporciona anticuerpos humanos específicos para la AML que son capaces de disminuir la proliferación de células de AML independientemente de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la apoptosis o la fagocitosis por células mieloides asociadas a tumores tales como macrófagos o células dendríticas. Preferentemente, dichos anticuerpos son capaces de disminuir la proliferación de células de AML independientemente (esencialmente) de cualquier otra célula inmunitaria, o del complemento o de la apoptosis. Como se muestra en los Ejemplos, dichos anticuerpos son capaces de disminuir o inhibir directamente el crecimiento de las células de AML, o incluso son capaces de destruir las células de AML, en ausencia de células inmunitarias como las células NK o los macrófagos, y en ausencia del complemento. Esta modalidad contrasta con los enfoques de la técnica anterior tales como, por ejemplo, los descritos en Majeti y otros, 2009 y Willingham y otros, 2012, en donde se usa un anticuerpo específico para CD47 para permitir la fagocitosis por macrófagos de las células tumorales. El documento WO 2009/051974 describe el uso de anticuerpos específicos para la molécula 1 similar a lectina de tipo C (CLL-1), que son capaces de inducir la CDC contra células de AML *in vitro* en presencia de complemento de conejo. Bakker y otros, 2004, sin embargo, no prevén que la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento a través de la CLL-1 sea un mecanismo de direccionamiento eficaz, y proponen anticuerpos contra la CLL-1 conjugados con toxinas para su uso contra la AML. El documento WO 2012/098407 describe el uso de anticuerpos específicos para la IL1RAP para inducir la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos contra las células de AML, mediante el reclutamiento de células NK que inducen la muerte de las células de AML. Por lo tanto, la técnica anterior descrita anteriormente se centra en el uso de anticuerpos para activar otras células inmunitarias, lo que puede no proporcionar los resultados deseados en individuos inmunocomprometidos, tales como los pacientes con AML que se han sometido a quimioterapia con o sin un SCT alogénico.

El documento WO 2013/071068 describe anticuerpos anti-CXCR4 que se generaron en ratones transcromosómicos transgénicos que expresan genes de anticuerpos humanos. Los anticuerpos obtenidos se unen a una gama amplia de células hematopoyéticas y son capaces de inhibir el crecimiento de una línea celular de AML *in vitro*. Estos anticuerpos anti-CXCR4 inducen la apoptosis de diversas líneas celulares de AML.

Además, se ha descrito la terapia con el anticuerpo monoclonal anti-CD33 contra la AML (Walther y otros, 2012). Por ejemplo, se describen anticuerpos específicos para CD33 acoplados a un conjugado de fármaco.

El documento WO 2010/102244 describe un anticuerpo anti-EphA3 humanizado que es capaz de inducir la apoptosis de las células de AML. Además, Biernacki y otros, 2010 y Wu y otros, 2000 describen anticuerpos obtenidos de pacientes con AML que son específicos para antígenos intracelulares tales como RAB38, TBCE, DUSP12 y RAFTK.

En conclusión, varias publicaciones describen anticuerpos para la AML que se unen a antígenos intracelulares. Dichos anticuerpos no son una primera opción para combatir células de AML intactas y vivas *in vivo* debido a la inaccesibilidad de dichos objetivos intracelulares cuando las células de AML están intactas. Otras publicaciones describen anticuerpos que se unen a una gama amplia de células hematopoyéticas, por ejemplo, a través de CD33, CXCR4, CD47 o CLL-1. Los anticuerpos que se unen a una gama amplia de células (hematopoyéticas) implican el riesgo de efectos secundarios graves.

Varios anticuerpos descritos en la técnica actúan al inducir la fagocitosis, la ADCC o la CDC, lo que significa que se

requieren otras células inmunitarias o componentes del complemento para contrarrestar las células de AML. El uso de dichos anticuerpos se limita, por lo tanto, en individuos inmunocomprometidos. Además, algunos de los anticuerpos descritos no son humanos, lo que implica un riesgo alto de efectos secundarios. Otras publicaciones (tales como los documentos WO 2013/071068 y WO 2010/102244) describen anticuerpos que inducen la apoptosis de las células de AML.

Por el contrario de las publicaciones mencionadas anteriormente, los presentes inventores han adoptado un enfoque diferente. En lugar de producir artificialmente anticuerpos contra un componente que está presente, entre otras cosas, en las células de AML, los inventores han aislado anticuerpos de pacientes humanos con AML que, después de recibir un SCT alogénico, montaron una respuesta de injerto contra leucemia potente mientras se mantenían en remisión completa. Estos anticuerpos son capaces de unirse específicamente al snRNP200 de células de AML intactas. Por lo tanto, en lugar de usar anticuerpos desarrollados artificialmente, los presentes inventores han tomado ventaja elegantemente de las defensas inmunitarias naturales provocadas en pacientes humanos con AML después de recibir un SCT alogénico. La respuesta humoral encontrada en la naturaleza resulta en una selección y crecimiento muy adecuados de células B que producen anticuerpos eficaces *in vivo*. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención, o partes funcionales o derivados funcionales de estos, son por lo tanto adecuados particularmente para unirse a células de AML en pacientes con AML. El hecho de que los anticuerpos son específicos para células de AML intactas, en lugar de antígenos intracelulares, los hace adecuados particularmente para la terapia de la AML.

Como se describe, un anticuerpo o una parte funcional de este de acuerdo con la invención puede acoplarse a un resto tóxico. Dicho resto tóxico se dirigirá después a las células de AML *in vivo* mediante la unión del anticuerpo a las células de AML. Una modalidad de la presente invención proporciona anticuerpos humanos, o partes funcionales de estos, que pueden unirse a células de AML intactas y que pueden disminuir la proliferación de células de AML. Dicho anticuerpo obvia la necesidad de acoplar el anticuerpo a un componente tóxico adicional (aunque el uso de un resto tóxico aún puede ser útil para proporcionar efectos adicionales contra la AML). En una modalidad preferida particularmente, se proporcionan anticuerpos humanos, o partes funcionales de estos, de acuerdo con la invención, que pueden unirse a células de AML intactas y que pueden disminuir la proliferación de células de AML independientemente de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la fagocitosis por células mieloides asociadas a tumores, tales como macrófagos o células dendríticas. Preferentemente, dichos anticuerpos son capaces de disminuir la proliferación de células de AML independientemente de, o esencialmente independientemente de, otras células inmunitarias o de componentes del complemento. Se prefiere el uso de dichos anticuerpos, que tienen una fuerte actividad contra la AML, especialmente en individuos inmunocomprometidos. Por lo tanto, un aspecto preferido de la presente invención proporciona un anticuerpo humano aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este, que puede unirse al snRNP de células de leucemia mieloide aguda (AML) y que puede disminuir la proliferación de células de AML independientemente de, o esencialmente independientemente de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la fagocitosis por células mieloides asociadas a tumores tales como macrófagos o células dendríticas. Preferentemente, dichos anticuerpos son capaces de disminuir la proliferación de células de AML independientemente (esencialmente) de cualquier otra célula inmunitaria o del complemento. Como se muestra en los Ejemplos, al menos los anticuerpos AT12-023, AT12-025 y AT13-024 tienen estas características. Estos son, por lo tanto, anticuerpos preferidos de acuerdo con la presente invención.

En una modalidad preferida adicional, se proporcionan anticuerpos humanos, o partes funcionales de estos, de acuerdo con la invención, que pueden unirse a células de AML intactas y que pueden disminuir la proliferación de células de AML independientemente de la apoptosis. Como se muestra en los Ejemplos, al menos los anticuerpos AT12-023, AT13-031 y AT13-037 tienen esta característica. Esto se desprende del hecho de que estos anticuerpos pueden inducir la muerte de células de AML en presencia de inhibidores de la apoptosis, tales como los inhibidores de las caspasas Q-VD-OPh o Z-VAD-fmk, y del hecho de que la mayoría de estos anticuerpos (excepto el anticuerpo AT13-031) mantienen sus propiedades citotóxicas a 4 °C. De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos tales como AT12-023, AT13-031 y AT13-037 destruyen sus células objetivo de AML por necrosis (tales como oncosis o necroptosis). Esto proporciona la ventaja sobre los anticuerpos inductores de apoptosis conocidos actualmente, de que los anticuerpos inductores de necrosis de acuerdo con la presente invención potenciarán la respuesta inmunitaria de un paciente más que los anticuerpos inductores de apoptosis. Esto se debe al hecho de que la necrosis causa una mayor exposición de los contenidos celulares al sistema inmunitario de un individuo. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo humano aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional o un equivalente funcional de este, que puede unirse a un componente de la superficie celular de las células de leucemia mieloide aguda (AML) y que puede disminuir la proliferación de las células de AML independientemente de, o independientemente esencialmente de, la apoptosis.

Se describen anticuerpos humanos, o partes funcionales o equivalentes funcionales de estos, de acuerdo con la invención, que pueden disminuir la proliferación de células de AML independientemente tanto de la apoptosis como de las células inmunitarias y del complemento mencionadas anteriormente. Por lo tanto, se describe además, un anticuerpo humano aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional o un equivalente funcional de este, que puede unirse a un componente de la superficie celular de las células de leucemia mieloide aguda (AML) y que puede disminuir la proliferación de las células de AML independientemente esencialmente de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la apoptosis o la fagocitosis por macrófagos o células dendríticas.

Un anticuerpo o una parte funcional de este de acuerdo con la invención es capaz de unirse a células de AML intactas. Dicho anticuerpo o parte funcional puede unirse a un componente de la superficie celular que es específico para las células de AML. Esto significa típicamente que las células no hematopoyéticas o las células hematopoyéticas no malignas, tales como, por ejemplo, los hepatocitos, las células del colon, los fibroblastos, las células endoteliales, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) sanas y las células de médula ósea sanas, no son, o en menor medida significativamente, reconocidas en comparación con la afinidad de unión de un anticuerpo o parte funcional o equivalente funcional de acuerdo con la invención para las células de AML. Esto significa que la unión de un anticuerpo o parte funcional o equivalente funcional de acuerdo con la invención a células no hematopoyéticas o células hematopoyéticas no malignas está típicamente en el mismo rango que la unión de un anticuerpo control irrelevante a estas células (en donde el anticuerpo control no es específico para dichas células). Sin embargo, parte de la reactividad hacia otros tipos de células hematopoyéticas malignas se abarca dentro del término "específico para la AML". Por ejemplo, en la Tabla 4 y la Figura 6 se muestra que los anticuerpos AT13-031 y AT12-023 son capaces de unirse a células de linfoma no Hodgkin B derivadas de pacientes. Por lo tanto, se proporciona además un uso del anticuerpo AT13-031 o el anticuerpo AT12-023, o una parte funcional de cualquiera de estos anticuerpos, para la preparación de un medicamento o agente profiláctico contra el linfoma no Hodgkin B, así como también el anticuerpo AT13-031 o el anticuerpo AT12-023, o una parte funcional de cualquiera de estos anticuerpos, para su uso en un método para tratar o prevenir al menos en parte el linfoma no Hodgkin B. De manera similar, los anticuerpos AT13-024, AT13-031 y AT12-019 son capaces de unirse a líneas celulares de linfoma y/o mieloma múltiple (Tabla 4). Se proporciona además, por lo tanto, el uso del anticuerpo AT13-024 o el anticuerpo AT13-031 o el anticuerpo AT12-019, o una parte funcional de cualquiera de estos anticuerpos, para la preparación de un medicamento o agente profiláctico contra la leucemia mieloide (AML) o el linfoma no Hodgkin B (B-HNL, por sus siglas en inglés), así como también el anticuerpo AT13-024 o el anticuerpo AT13-031 o el anticuerpo AT12-019, o una parte funcional o derivado funcional de cualquiera de estos anticuerpos, para su uso en un método para tratar o prevenir al menos en parte la leucemia mieloide (AML) o el linfoma no Hodgkin B (B-HNL).

Como se usa en la presente, el término "células de AML" abarca las células de AML naturales, tales como los blastos de AML primarios que están presentes en los pacientes con AML, así como también las líneas celulares de AML tales como, por ejemplo, THP-1, Mono-Mac 6 y Molm13.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere a una proteína de inmunoglobulina que comprende al menos una región variable de cadena pesada (VH), apareada con una región variable de cadena ligera (VL), que es específica para un epítipo objetivo.

En la presente descripción se define una "parte funcional de un anticuerpo" como una parte que tiene al menos una propiedad compartida con dicho anticuerpo en tipo, no necesariamente en cantidad. Dicha parte funcional es capaz de unirse al mismo antígeno que dicho anticuerpo, aunque no necesariamente en la misma medida. En una modalidad, una parte funcional de un anticuerpo comprende al menos un dominio variable de cadena pesada (VH). Los ejemplos no limitantes de una parte funcional de un anticuerpo son un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo de cadena única, un nanocuerpo, un unicuerpo, un fragmento variable de cadena única (scFv, por sus siglas en inglés), un fragmento Fab y un fragmento F(ab')₂.

Como se conoce bien por el experto en la técnica, una cadena pesada de un anticuerpo es la mayor de los dos tipos de cadenas que forman una molécula de inmunoglobulina. Una cadena pesada comprende un dominio constante y un dominio variable, cuyo dominio variable se involucra en la unión al antígeno. Una cadena ligera de un anticuerpo es la más pequeña de los dos tipos de cadenas que forman una molécula de inmunoglobulina. Una cadena ligera comprende un dominio constante y un dominio variable. A menudo, pero no siempre, el dominio variable se involucra junto con el dominio variable de la cadena pesada en la unión al antígeno.

Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) son las regiones hipervariables presentes en los dominios variables de cadena pesada y los dominios variables de cadena ligera. En el caso de los anticuerpos completos, las CDR 1-3 de una cadena pesada y las CDR 1-3 de la cadena ligera conectada forman juntas el sitio de unión al antígeno.

Como se usa en la presente, el término "un anticuerpo o parte funcional de acuerdo con la invención" se denomina, además, como "un compuesto de unión de acuerdo con la invención".

El término "componente de la superficie celular de las células de AML" significa cualquier componente que esté presente al menos en parte en o sobre la superficie celular de las células de AML, o un componente que se une a una superficie de la célula de AML. Los ejemplos no limitantes de componentes de la superficie celular de las células de AML son las proteínas (trans)membrana, las glucoproteínas y cualquier compuesto unido a ellas.

Los términos "específico para" y "capaz de unirse específicamente" se usan en la presente descripción indistintamente y se refieren a la interacción entre un anticuerpo, o una parte funcional o equivalente funcional de este, y su epítipo. Esto significa que dicho anticuerpo, o una parte funcional de este, se une preferentemente a dicho epítipo por sobre otros antígenos o secuencias de aminoácidos. Por lo tanto, aunque el anticuerpo o la parte funcional pueden unirse no específicamente a otros antígenos o secuencias de aminoácidos, la afinidad de unión de dicho anticuerpo o parte funcional

por su epítipo es mayor significativamente que la afinidad de unión no específica de dicho anticuerpo o parte funcional por otros antígenos o secuencias de aminoácidos.

5 Un anticuerpo o parte funcional de acuerdo con la invención que puede unirse a un epítipo particular de las células de AML puede ser específico, además, para otras células que no son de AML si dicho epítipo de las células de AML se presenta también en otras células (por ejemplo, otras células leucémicas, células de mieloma o células de linfoma). En ese caso, un anticuerpo al que se hace referencia en la presente descripción como que es específico para las células de AML es específico, además, para dichas otras células que comprenden el mismo epítipo. Preferentemente, los anticuerpos humanos para la AML y partes funcionales de estos, según lo proporcionado en el presente documento, no se unen significativamente a células no hematopoyéticas y células hematopoyéticas no malignas.

15 "Afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de un anticuerpo o parte funcional o equivalente funcional y su par de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de cualquier otra manera, como se usa en la presente, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad puede representarse generalmente por la constante de disociación de equilibrio (K_D), que se calcula como la relación k_a con respecto a k_d , ver, por ejemplo, Chen, Y., y otros, (1999) J. Mol Biol 293:865-881. La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR) tal como el instrumento BiaCore o IBIS-iSPR en IBIS Technologies BV (Hengelo, Países Bajos) o ensayos en fase de solución, tal como Kinexa. Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión por un epítipo en o sobre la superficie celular de las células de AML caracterizada por una constante de disociación (K_D) de a lo máximo 100 nM, con mayor preferencia a lo máximo 50 nM, con mayor preferencia a lo máximo 25 nM, con mayor preferencia a lo máximo 10 nM, con mayor preferencia a lo máximo 5 nM, con mayor preferencia a lo máximo 2 nM, con mayor preferencia a lo máximo 1 nM, con mayor preferencia a lo máximo 0,5 nM, con mayor preferencia a lo máximo 0,3 nM, con mayor preferencia a lo máximo 0,1 nM.

30 El porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos, o el término "% de identidad de secuencia", se define en la presente descripción como el porcentaje de residuos en una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos candidata que es idéntica a los residuos en una secuencia de referencia después de alinear las dos secuencias e introducir los huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje de identidad máximo. Los métodos y programas de computadora para la alineación se conocen bien en la técnica, por ejemplo, "Align 2".

35 En una modalidad preferida particularmente, se proporciona un anticuerpo o parte funcional de acuerdo con la invención que puede inducir la muerte de blastos de AML primarios. Dado que los blastos de AML primarios se derivan directamente de un paciente con AML, a diferencia de las líneas celulares disponibles comercialmente, la actividad de un anticuerpo contra dichos blastos de AML es aún más indicativa para una situación *in vivo*. Como se muestra en los Ejemplos, al menos los anticuerpos AT13-024 y AT12-025 tienen esta característica. Se prefieren, por lo tanto, estos anticuerpos. En una modalidad preferida particularmente, se proporciona un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, que puede inducir la muerte de blastos de AML primarios independientemente de, o independientemente esencialmente de, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la apoptosis y/o la fagocitosis por macrófagos o células dendríticas. Preferentemente, dichos compuestos de unión son capaces de inducir la muerte de blastos de AML independientemente esencialmente de otras células inmunitarias, o del complemento o de la apoptosis. Los anticuerpos AT13-024 y AT12-025 también tienen esta característica preferida.

45 Como se usa en la presente, el término "independientemente esencialmente de la ADCC, la CDC o la fagocitosis por células mieloides asociadas a tumores tales como macrófagos o células dendríticas" significa que no se requiere ADCC, CDC o fagocitosis por células mieloides asociadas a tumores tales como macrófagos o células dendríticas para un efecto contra la AML inducido por un compuesto de unión de acuerdo con la presente invención, aunque en una situación *in vivo* también puede producirse ADCC, CDC o fagocitosis por células mieloides asociadas a tumores tales como macrófagos o células dendríticas. Por lo tanto, en esta modalidad, la ADCC, la CDC y la fagocitosis por células mieloides asociadas a tumores tales como macrófagos o células dendríticas no se excluyen, pero tampoco son esenciales. Igualmente, el término "independientemente esencialmente de otras células inmunitarias o del complemento" significa que un compuesto de unión de acuerdo con la invención es, en principio, capaz de ejercer un efecto contra la AML sin la presencia de otras células inmunitarias o del complemento, aunque en una situación *in vivo* otras células inmunitarias o del complemento también pueden tener una actividad contra la AML. El término "independientemente esencialmente de la apoptosis" significa que el efecto contra la AML se ejerce por un compuesto de unión de acuerdo con la presente invención mediante un mecanismo distinto de la apoptosis. Preferentemente, dicho efecto contra la AML se ejerce mediante la necrosis.

60 En una modalidad preferida adicional, se proporciona un anticuerpo o una parte funcional de este de acuerdo con la invención que puede disminuir la proliferación de células de AML *in vitro* dentro de 7 días, preferentemente dentro de 5 días, con mayor preferencia dentro de 3 días y aún con mayor preferencia dentro de 1 día. Esto indica un efecto terapéutico rápido.

65 La presente invención proporciona anticuerpos humanos aislados, sintéticos y recombinantes, y partes funcionales de estos, que pueden unirse a células de AML intactas. Dichas células de AML pertenecen preferentemente a una

clasificación franco-estadounidense-británica (FAB, por sus siglas en inglés) seleccionada del grupo que consiste en M5, M0, M1, M2, M3 y M4. Con mayor preferencia, dichas células de AML pertenecen a la clasificación FAB M5 o M1 o M0 o M4, preferentemente M5. Estas son las clasificaciones FAB que se encuentran comúnmente en los pacientes con AML. En una modalidad preferida adicional, se proporcionan anticuerpos humanos aislados, sintéticos y recombinantes, o partes funcionales o equivalentes funcionales de estos, que pueden unirse a células de AML diferentes de al menos dos, preferentemente al menos tres, con mayor preferencia al menos cuatro clasificaciones FAB diferentes. Dichos anticuerpos son útiles para diferentes pacientes con AML que tienen clasificaciones FAB diferentes, por lo que estos anticuerpos son aplicables ampliamente. Como se muestra en la Tabla 3, el anticuerpo AT12-025 es capaz de unirse a células de AML de al menos dos clasificaciones FAB (M5 + M1). Este es, por lo tanto, un anticuerpo preferido de acuerdo con la invención. El anticuerpo AT13-031 también es capaz de unirse a células de AML de al menos tres clasificaciones FAB (M5 + M1 + M4). Se prefiere aún más, por lo tanto, estos anticuerpos. Además, el anticuerpo AT12-023 es capaz de unirse a células de AML de al menos cuatro clasificaciones FAB (M5 + M0 + M1 + M4). Este anticuerpo es, por lo tanto, aún más aplicable ampliamente y, por lo tanto, se prefiere particularmente.

En una modalidad preferida particularmente, un anticuerpo o parte funcional de acuerdo con la invención es del isotipo IgG, preferentemente IgG1 o IgG3. Esto es beneficioso para aplicaciones médicas en humanos.

Las Tablas 1A y 1B, y la Figura 1, proporcionan una información general de las secuencias variables de cadenas pesadas y ligeras, así como también las secuencias CDR individuales, de los anticuerpos AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 y AT14-016. Estos son anticuerpos preferidos de acuerdo con la invención, obtenidos de tres pacientes humanos con AML. Los términos "AT12-023", "AT12-025", "AT13-024", "AT12-019", "AT13-022", "AT13-023", "AT13-031", "AT12-020", "AT13-033", "AT13-034", "AT13-035", "AT13-036", "AT13-037", "AT14-013", "AT14-014", "AT14-015" y "AT14-016" como se usa en la presente, abarcan todos los anticuerpos y partes funcionales y equivalentes funcionales que tienen al menos las regiones CDR1-3 de las cadenas pesadas y ligeras, preferentemente las secuencias variables de las cadenas pesadas y cadenas ligeras de estos anticuerpos, como se representa en las Tablas 1A y 1B y la Figura 1, tales como, por ejemplo, anticuerpos aislados y/o purificados o anticuerpos producidos recombinantemente.

Como se usa en la presente, cualquier referencia a la "Tabla 1" incluye una referencia a la Tabla 1A y/o la Tabla 1B.

Basado en los anticuerpos representados en la Tabla 1 y la Figura 1, es posible producir un anticuerpo o una parte funcional de este que comprende al menos una secuencia CDR de un anticuerpo representado en la Tabla 1 o la Figura 1, que es específica para las células de AML. Por lo tanto, se describe un anticuerpo aislado, recombinante y/o sintético o una parte funcional o equivalente funcional de este que comprende al menos una secuencia CDR de un anticuerpo como se representa en la Tabla 1. Dicha secuencia CDR es preferentemente una secuencia CDR3 de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, preferentemente al menos tres CDR de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos AT12-023, AT12-025, AT13-031, AT13-033, AT13-035 o AT13-037 se presentan conjuntamente en un compuesto de unión de acuerdo con la invención. Opcionalmente, al menos una de dichas secuencias CDR se optimiza, lo que genera de esta manera un compuesto de unión variante, preferentemente para mejorar la eficacia, selectividad o estabilidad de unión. Esto se realiza, por ejemplo, mediante procedimientos de mutagénesis en los que, después de probar preferentemente la estabilidad y/o eficacia de unión de los compuestos resultantes, se selecciona un compuesto de unión mejorado específico para la AML. Un experto en la técnica es muy capaz de generar variantes que comprendan al menos una secuencia CDR alterada de acuerdo con la invención. Por ejemplo, se aplica la sustitución conservadora de aminoácidos. Los ejemplos de sustitución conservadora de aminoácidos incluyen la sustitución de un residuo hidrofóbico tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro residuo hidrofóbico, y la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina. Dichos compuestos de unión comprenden secuencias CDR 1-3 de cadena pesada y cadena ligera que son al menos un 90 % idénticas a las secuencias CDR 1-3 de cadena pesada y ligera del mismo anticuerpo representado en la Tabla 1 o la Figura 1. Preferentemente, las secuencias CDR difieren en no más de tres, preferentemente en no más de dos, preferentemente en no más de un aminoácido de las secuencias CDR originales de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Además de optimizar las secuencias CDR para mejorar la eficacia o la estabilidad de unión, puede optimizarse al menos una secuencia en al menos una de las regiones marco. Esto se hace preferentemente para mejorar la eficacia o la estabilidad de unión. Las secuencias marco se optimizan, por ejemplo, mediante la mutación de una molécula de ácido nucleico que codifica dicha secuencia marco, donde después se prueban preferentemente las características del anticuerpo resultante, o parte funcional o equivalente funcional. De esta manera, es posible obtener compuestos de unión mejorados. En una modalidad preferida, se usan las secuencias de la línea germinal humana para las regiones marco en anticuerpos de acuerdo con la invención. El uso de secuencias de la línea germinal humana minimiza el riesgo de inmunogenicidad de dichos anticuerpos, debido a que estas secuencias tienen menos probabilidad de contener alteraciones somáticas que son únicas para los individuos de los que se derivan las regiones marco, y que pueden causar una respuesta inmunogénica cuando se aplican a otro individuo humano. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo sintético o recombinante o parte funcional de acuerdo con la invención, que comprende al menos una mutación no natural en una región marco. Adicionalmente, o alternativamente, se proporciona un anticuerpo sintético o recombinante o una parte funcional de acuerdo con la invención que comprende al menos una mutación no natural en una región constante. Por una "mutación no natural" se entiende que la secuencia de aminoácidos resultante no se

produce en la naturaleza. En su lugar, se ha producido artificialmente. En una modalidad, una región Fc de IgG3 del anticuerpo AT12-023 o AT12-025, se reemplaza al menos parcialmente por una región Fc de IgG1. Esto aumenta típicamente la estabilidad y la vida media de la inmunoglobulina resultante.

5 Un compuesto de unión de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente una región variable humana. Con mayor preferencia, dicho compuesto de unión comprende una región constante humana y una región variable humana. Con la máxima preferencia, dicho compuesto de unión es un anticuerpo humano. El uso de anticuerpos humanos específicos para la AML es ventajoso por sobre el uso de anticuerpos no humanos. El uso *in vivo* de anticuerpos no humanos para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades humanas se ve obstaculizado por una serie de factores.
10 En particular, el cuerpo humano puede reconocer los anticuerpos no humanos como extraños, lo que resultará en una respuesta inmunogénica contra los anticuerpos no humanos, lo que da como resultado efectos secundarios adversos y/o una eliminación rápida de los anticuerpos de la circulación. Un anticuerpo humano disminuye la posibilidad de efectos secundarios cuando se administra a un individuo humano y a menudo resulta en una vida media más larga en la circulación debido a un aclaramiento reducido en comparación con los anticuerpos no humanos. En otra modalidad, un compuesto de unión de acuerdo con la invención es un anticuerpo humanizado. En otra modalidad, un compuesto de unión de acuerdo con la invención es un anticuerpo quimérico. En un anticuerpo quimérico, las secuencias de interés, tales como, por ejemplo, un sitio de unión adicional de interés, se incluyen en un compuesto de unión de acuerdo con la invención.

Además, los compuestos de unión de acuerdo con la invención son preferentemente anticuerpos monoclonales. Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que consiste de una sola especie molecular. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse en grandes cantidades mediante células productoras de anticuerpos monoclonales o tecnología de ADN recombinante.

Por lo tanto, pueden generarse además variantes de compuestos de unión basados en los anticuerpos preferidos representados en la Tabla 1 y la Figura 1, mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, la mutagénesis. Típicamente, se toleran las variaciones de secuencia entre el 80 y 99 % mientras mantengan una cierta especificidad de antígeno. Por lo tanto, los compuestos de unión de acuerdo con la invención que comprenden una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con al menos una secuencia CDR de cualquiera de los anticuerpos de la Tabla 1 o la Figura 1, se describen también en la presente descripción. Dado que la especificidad antigénica de un anticuerpo se domina típicamente por las secuencias CDR3, una variante de anticuerpo comprende al menos, preferentemente, una secuencia CDR3 de cadena pesada que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con una secuencia CDR3 de cadena pesada como se representa en la Tabla 1 o la Figura 1. Dicha variante de anticuerpo comprende, preferentemente, una secuencia CDR3 de cadena pesada y una secuencia CDR3 de cadena ligera que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con las secuencias CDR3 de cadena pesada y ligera del mismo anticuerpo, seleccionadas del grupo que consiste en AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 y AT14-016.

Un anticuerpo preferido de acuerdo con la presente invención es el anticuerpo AT12-023. Se prefiere este anticuerpo porque es capaz de unirse y destruir eficientemente células de la línea celular de AML THP-1, como se muestra en los Ejemplos y en las Figuras 7 y 8. Este anticuerpo es, por lo tanto, adecuado particularmente para la terapia y/o el diagnóstico de la AML. Curiosamente, el AT12-023 es del isotipo IgG3 y pertenece a la familia VH4-34, que es una familia de secuencias VH conocida por sus propiedades de destrucción potenciales (Bhat y otros, 1997). El anticuerpo AT12-023 es capaz, además, de unirse eficientemente a blastos de AML primarios de al menos cuatro clasificaciones FAB diferentes (Tabla 3). Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo AT12-023 son las SEQ ID NO 1, 14, 27, 40, 53 y 66, respectivamente, como se representa en la Tabla 1. Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este, que comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1; y
- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14; y
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 27; y
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 40; y
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 53; y
- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 66. Preferentemente, dichas identidades de secuencia son al menos el 91 %, con mayor preferencia al menos el 92 %, con mayor preferencia al menos el 93 %, con mayor preferencia al menos el 94 %, con mayor preferencia al menos el 95 %, con mayor preferencia al menos el 96 %, con mayor preferencia al menos el 97 %, con mayor preferencia al menos el 98 %, con mayor preferencia al menos el 99 %, con mayor preferencia el 100 %. Como se describió anteriormente en la presente descripción, al menos 1, 2 o 3 residuos de aminoácidos en las secuencias CDR citadas pueden variar mientras mantengan el mismo tipo de actividad de unión

(en tipo, no necesariamente en cantidad). Por lo tanto, dichas secuencias CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada y ligera contienen preferentemente secuencias CDR derivadas del anticuerpo AT12-023 que difieren en no más de tres, preferentemente no más de dos, con mayor preferencia no más de un aminoácido de las secuencias CDR del AT12-023 citadas.

5

Otro anticuerpo preferido de acuerdo con la presente invención es el anticuerpo AT12-025. Se prefiere este anticuerpo porque es capaz de unir y destruir eficazmente células de la línea celular de AML THP-1, así como también blastos de AML primarios derivados del paciente, como se muestra en los Ejemplos y las Figuras 8 y 10. Este anticuerpo es, por lo tanto, adecuado particularmente para la terapia y/o el diagnóstico de la AML. Curiosamente, el AT12-025 es del isotipo IgG3 y pertenece a la familia VH4-34, que es una familia de secuencias VH conocida por sus propiedades de destrucción potenciales (Bhat y otros, 1997). Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo AT12-025 son las SEQ ID NO 2, 15, 28, 41, 54 y 67, respectivamente, como se muestra en la Tabla 1. Por lo tanto, la invención proporciona además un anticuerpo aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este, que comprende:

15

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2; y
- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15; y
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 28; y
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 41; y
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 54; y
- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 67. De nuevo, dichas identidades de secuencia son preferentemente al menos el 91 %, con mayor preferencia al menos el 92 %, con mayor preferencia al menos el 93 %, con mayor preferencia al menos el 94 %, con mayor preferencia al menos el 95 %, con mayor preferencia al menos el 96 %, con mayor preferencia al menos el 97 %, con mayor preferencia al menos el 98 %, con mayor preferencia al menos el 99 %, con mayor preferencia el 100 %. Como se describió anteriormente, al menos 1, 2 o 3 residuos de aminoácidos en las secuencias CDR del AT12-025 citadas pueden variar mientras mantengan el mismo tipo de actividad de unión (en tipo, no necesariamente en cantidad). Por lo tanto, las secuencias CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera mencionadas anteriormente contienen preferentemente secuencias CDR que difieren en no más de tres, preferentemente no más de dos, con mayor preferencia no más de un aminoácido de las secuencias CDR del AT12-025 citadas.

35

La invención proporciona además un anticuerpo aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este, que comprende:

40

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7; y
- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20; y
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 33; y
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 46; y
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 59; y
- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 72. Estas son las secuencias CDR del anticuerpo AT13-031. Curiosamente, el AT13-031 pertenece a la familia VH4-34, que es una familia de secuencias VH conocida por sus propiedades de destrucción potenciales (Bhat y otros, 1997). El anticuerpo AT13-031, derivado de un paciente humano con AML en remisión completa, es capaz de unirse y destruir específicamente a células intactas de AML. Además, se prefiere este anticuerpo porque es capaz de unirse y destruir eficientemente las células de la línea celular de AML THP-1. Por lo tanto, un compuesto de unión que contiene secuencias CDR derivadas del AT13-031 es adecuado particularmente para la terapia y/o diagnóstico de la AML. Dicho compuesto de unión se usa, por ejemplo, como un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés), de manera que un compuesto tóxico se dirigirá a las células de AML, o se usa mediante la inducción de CDC y/o ADCC. Alternativamente, o adicionalmente, dicho compuesto de unión puede usarse para marcar células de AML para fagocitosis específica por células mieloides asociadas a tumores tales como macrófagos o células dendríticas, células que pueden inducir subsecuentemente una respuesta inmunitaria específica de la AML. De nuevo, dichas identidades de secuencia son preferentemente al menos el 91 %, con mayor preferencia al menos el 92 %, con mayor preferencia al menos el 93 %, con mayor preferencia al menos el 94 %, con mayor preferencia al menos el 95 %, con mayor preferencia al menos el 96 %, con mayor preferencia al menos el 97 %, con mayor

55

60

preferencia al menos el 98 %, con mayor preferencia al menos el 99 %, con mayor preferencia el 100 %. Como se describió anteriormente, al menos 1, 2 o 3 residuos de aminoácidos en las secuencias CDR del AT13-031 citadas pueden variar mientras mantengan el mismo tipo de actividad de unión (en tipo, no necesariamente en cantidad). Por lo tanto, las secuencias CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera mencionadas anteriormente contienen preferentemente secuencias CDR que difieren en no más de tres, preferentemente no más de dos, con mayor preferencia no más de un aminoácido de las secuencias CDR del AT13-031 citadas.

La invención proporciona además un anticuerpo aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este, que comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9; y
- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22; y
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 35; y
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 48; y
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 61; y
- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 74. Estas son las secuencias CDR del anticuerpo AT13-033. El anticuerpo AT13-033, derivado de un paciente humano con AML en remisión completa, es capaz de unirse específicamente a células intactas de AML. Además, se prefiere este anticuerpo porque es capaz de unirse y destruir eficientemente las células de la línea celular de AML THP-1. Por lo tanto, un compuesto de unión que contiene secuencias CDR derivadas del AT13-033 es adecuado particularmente para la terapia y/o diagnóstico de la AML. Dicho compuesto de unión se usa, por ejemplo, como un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), de manera que un compuesto tóxico se dirigirá a las células de AML, o se usa mediante la inducción de CDC y/o ADCC. Alternativamente, o adicionalmente, dicho compuesto de unión puede usarse para marcar células de AML para fagocitosis específica por células mieloides asociadas a tumores tales como macrófagos o células dendríticas, células que pueden inducir subsecuentemente una respuesta inmunitaria específica de la AML. De nuevo, dichas identidades de secuencia son preferentemente al menos el 91 %, con mayor preferencia al menos el 92 %, con mayor preferencia al menos el 93 %, con mayor preferencia al menos el 94 %, con mayor preferencia al menos el 95 %, con mayor preferencia al menos el 96 %, con mayor preferencia al menos el 97 %, con mayor preferencia al menos el 98 %, con mayor preferencia al menos el 99 %, con mayor preferencia el 100 %. Como se describió anteriormente, al menos 1, 2 o 3 residuos de aminoácidos en las secuencias CDR del AT13-033 citadas pueden variar mientras mantengan el mismo tipo de actividad de unión (en tipo, no necesariamente en cantidad). Por lo tanto, las secuencias CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera mencionadas anteriormente contienen preferentemente secuencias CDR que difieren en no más de tres, preferentemente no más de dos, con mayor preferencia no más de un aminoácido de las secuencias CDR del AT13-033 citadas.

La invención proporciona además un anticuerpo aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este, que comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11; y
- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 24; y
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 37; y
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 50; y
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 63; y
- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 76. Estas son las secuencias CDR del anticuerpo AT13-035. El anticuerpo AT13-035, derivado de un paciente humano con AML en remisión completa, es capaz de unirse específicamente a células intactas de AML. Además, se prefiere este anticuerpo porque es capaz de unirse y destruir eficientemente las células de la línea celular de AML THP-1. Por lo tanto, un compuesto de unión que contiene secuencias CDR derivadas del AT13-035 es adecuado particularmente para la terapia y/o diagnóstico de la AML. Dicho compuesto de unión se usa, por ejemplo, como un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), de manera que un compuesto tóxico se dirigirá a las células de AML, o se usa mediante la inducción de CDC y/o ADCC. Alternativamente, o adicionalmente, dicho compuesto de unión puede usarse para marcar células de AML para fagocitosis específica por células mieloides asociadas a tumores tales como macrófagos o células dendríticas, células que pueden inducir subsecuentemente una respuesta inmunitaria

específica de la AML. De nuevo, dichas identidades de secuencia son preferentemente al menos el 91 %, con mayor preferencia al menos el 92 %, con mayor preferencia al menos el 93 %, con mayor preferencia al menos el 94 %, con mayor preferencia al menos el 95 %, con mayor preferencia al menos el 96 %, con mayor preferencia al menos el 97 %, con mayor preferencia al menos el 98 %, con mayor preferencia al menos el 99 %, con mayor preferencia el 100 %.

Como se describió anteriormente, al menos 1, 2 o 3 residuos de aminoácidos en las secuencias CDR del AT13-035 citadas pueden variar mientras mantengan el mismo tipo de actividad de unión (en tipo, no necesariamente en cantidad). Por lo tanto, las secuencias CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera mencionadas anteriormente contienen preferentemente secuencias CDR que difieren en no más de tres, preferentemente no más de dos, con mayor preferencia no más de un aminoácido de las secuencias CDR del AT13-035 citadas.

La invención proporciona además un anticuerpo aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este, que comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13; y
 - una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26; y
 - una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 39; y
 - una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 52; y
 - una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 65; y
 - una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 78.
- Estas son las secuencias CDR del anticuerpo AT13-037. El anticuerpo AT13-037, derivado de un paciente humano con AML en remisión completa, es capaz de unirse específicamente a células intactas de AML. Además, se prefiere este anticuerpo porque es capaz de unirse y destruir eficientemente las células de la línea celular de AML THP-1, así como también los blastos de AML primarios derivados del paciente, como se muestra en los Ejemplos. Por lo tanto, un compuesto de unión que contiene secuencias CDR derivadas del AT13-037 es adecuado particularmente para la terapia y/o diagnóstico de la AML. Dicho compuesto de unión se usa, por ejemplo, como un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), de manera que un compuesto tóxico se dirigirá a las células de AML, o se usa mediante la inducción de CDC y/o ADCC. Alternativamente, o adicionalmente, dicho compuesto de unión puede usarse para marcar células de AML para fagocitosis específica por células mieloides asociadas a tumores tales como macrófagos o células dendríticas, células que pueden inducir subsecuentemente una respuesta inmunitaria específica de la AML. De nuevo, dichas identidades de secuencia son preferentemente al menos el 91 %, con mayor preferencia al menos el 92 %, con mayor preferencia al menos el 93 %, con mayor preferencia al menos el 94 %, con mayor preferencia al menos el 95 %, con mayor preferencia al menos el 96 %, con mayor preferencia al menos el 97 %, con mayor preferencia al menos el 98 %, con mayor preferencia al menos el 99 %, con mayor preferencia el 100 %.
- Como se describió anteriormente, al menos 1, 2 o 3 residuos de aminoácidos en las secuencias CDR del AT13-037 citadas pueden variar mientras mantengan el mismo tipo de actividad de unión (en tipo, no necesariamente en cantidad). Por lo tanto, las secuencias CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera mencionadas anteriormente contienen preferentemente secuencias CDR que difieren en no más de tres, preferentemente no más de dos, con mayor preferencia no más de un aminoácido de las secuencias CDR del AT13-037 citadas.

Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una secuencia variable de cadena pesada y/o una secuencia variable de cadena ligera como se representa en la Tabla 1 o la Figura 1, o una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con ellas. Como se muestra en la Tabla 1, las secuencias variables de cadena pesada de los anticuerpos AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 y AT14-016 son las SEQ ID NO 79-91 y 233-236, respectivamente. Las secuencias variables de cadena ligera de los anticuerpos AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 y AT14-016 son las SEQ ID NO 92-104 y 237-240, respectivamente. Se proporciona además, por lo tanto, un anticuerpo o una parte funcional de este de acuerdo con la invención, que comprende una secuencia variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 79, 80, 85, 87, 89 y 91, y/o que comprende una secuencia variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 92, 93, 98, 100, 102 y 104, o secuencias que son al menos el 91 %, con mayor preferencia al menos el 92 %, con mayor preferencia al menos el 93 %, con mayor preferencia al menos el 94 %, con mayor preferencia al menos el 95 %, con mayor preferencia al menos el 96 %, con mayor preferencia al menos el 97 %, con mayor preferencia al menos el 98 %, con mayor preferencia al menos el 99 %, o incluso el 100 % idénticas a cualquiera de estas secuencias de cadena pesada o de cadena ligera. Cuanta más alta es la identidad, más fielmente se parece un anticuerpo a un anticuerpo representado en la Figura 1. Preferentemente, un compuesto de unión de acuerdo con la invención comprende la secuencia variable de cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos representados en la Figura 1, junto con la secuencia variable de cadena ligera del mismo anticuerpo, o secuencias de cadena pesada y ligera que son al menos el

5 el 90 %, o al menos el 91 %, o al menos el 92 %, o al menos el 93 %, o al menos el 94 %, o al menos el 95 %, o al menos el 96 %, o al menos el 97 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 %, o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 91. Preferentemente, dicho compuesto de unión comprende además una secuencia variable de cadena ligera que tiene al menos el 90 %, o al menos el 91 %, o al menos el 92 %, o al menos el 93 %, o al menos el 94 %, o al menos el 95 %, o al menos el 96 %, o al menos el 97 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 104.

10 Un anticuerpo o una parte funcional de este de acuerdo con la invención es capaz de unirse al snRNP200 de células de AML. El snRNP200, también conocido como U5-snRNP, es un complejo de proteínas que forma parte del espliceosoma en todas las células eucarióticas. Normalmente, el snRNP200 se localiza en el núcleo. Sin embargo, la presente invención proporciona la sorprendente revelación de que el snRNP200 se presenta además sobre la superficie de las células de AML. Este antígeno se une por al menos los anticuerpos AT12-023, AT13-031 y AT13-037, y partes funcionales de estos. Por lo tanto, el snRNP200 es un objetivo importante para la terapia contra la AML y, por lo tanto, los anticuerpos específicos para el snRNP200 de acuerdo con la invención son adecuados particularmente para contrarrestar estas células.

15 La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, que codifica al menos la secuencia variable de cadena pesada y/o la secuencia variable de cadena ligera de un anticuerpo o parte funcional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde preferentemente dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 183, 184, 189, 191, 193 y 195, y/o que comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 196, 197, 202, 204, 206 y 208. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención se aísla, por ejemplo, a partir de una célula B que es capaz de producir un anticuerpo de acuerdo con la invención. Dicha célula B produce preferentemente el anticuerpo AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015, o AT14-016.

20 Las secuencias de ácido nucleico que codifican las CDR de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 y AT14-016 se representan en la Tabla 1. Las moléculas de ácido nucleico que codifican una CDR de cadena pesada o ligera de un anticuerpo de acuerdo con la invención que difieren de las secuencias de ácidos nucleicos de CDR representadas en la Tabla 1, pero que tienen codones de ácido nucleico que codifican los mismos aminoácidos de dicha CDR de cadena pesada o ligera, también se abarcan por la invención. Dichas moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, comprenden secuencias de ácidos nucleicos que se han optimizado en codones para una célula productora, tal como por ejemplo, *E. coli* o células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), células NSO (un mieloma de ratón) o células 293(T), que permiten la producción a gran escala de compuestos de unión de acuerdo con la invención. Debe señalarse que la producción de anticuerpos puede realizarse mediante cualquier sistema de producción de anticuerpos recombinantes; los cuatro sistemas celulares productores mencionados aquí son solo algunos ejemplos de los muchos sistemas disponibles hasta la fecha. Como se usa en la presente, el término "codón" significa un triplete de nucleótidos (o equivalentes funcionales de estos) que codifican un residuo de aminoácido específico. El término "optimizado en codones" significa que uno o más codones de la secuencia de ácidos nucleicos humana original se reemplazan por uno o más codones que se prefieren mediante un cierto sistema de producción de anticuerpos. Estos codones de reemplazo codifican preferentemente el mismo residuo de aminoácido que el codón humano original que se ha reemplazado. Alternativamente, uno o más codones de reemplazo codifican un resto de aminoácido diferente. Esto produce preferentemente una sustitución conservadora de aminoácidos, aunque esto no es necesario. Típicamente, en regiones constantes y regiones marco se permite generalmente una o más sustituciones de aminoácidos. En las regiones CDR, se usan preferentemente codones que codifican el mismo residuo de aminoácido que el codón humano original que se ha reemplazado.

30 Se proporciona además un vector que comprende una molécula de ácido nucleico aislada, recombinante o sintética, que codifica al menos la secuencia variable de cadena pesada y/o la secuencia variable de cadena ligera de un anticuerpo o parte funcional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde preferentemente dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 183, 184, 189, 191, 193 y 195, y/o que comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 196, 197, 202, 204, 206 y 208. Preferentemente, la CDR resultante difiere en no más de tres, preferentemente en no más de dos, preferentemente en solo un aminoácido de la secuencia CDR original de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

35 Dichas identidades de secuencia son preferentemente al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 90 %, con la máxima preferencia al menos 95 % de secuencia, con la máxima preferencia 100 %.

40 Una molécula o vector(es) de ácido nucleico preferido de acuerdo con la invención comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 183, 184, 189, 191, 193 y 195, y/o que comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 196, 197, 202, 204, 206 y 208. Dichas

identidades de secuencias son preferentemente al menos el 85 %, con mayor preferencia al menos el 86 %, con mayor preferencia al menos el 87 %, con mayor preferencia al menos el 88 %, con mayor preferencia al menos el 89 %, con mayor preferencia al menos el 90 %, con mayor preferencia al menos el 91 %, con mayor preferencia al menos el 92 %, con mayor preferencia al menos el 93 %, con mayor preferencia al menos el 94 %, con mayor preferencia al menos el 95 %, con mayor preferencia al menos el 96 %, con mayor preferencia al menos el 97 %, con mayor preferencia al menos el 98 %, con mayor preferencia al menos el 99 %, con mayor preferencia el 100 %.

Con mayor preferencia, una molécula de ácido nucleico o uno o más vectores de acuerdo con la invención comprende(n) una secuencia codificadora variable de cadena pesada así como también una secuencia codificadora variable de cadena ligera que se asemejan a las secuencias codificadoras variables de cadena ligera y pesada del mismo anticuerpo representado en la Tabla 1. Por lo tanto, en una modalidad preferida, una molécula de ácido nucleico o vector(es) de acuerdo con la invención comprende(n) la secuencia codificadora variable de cadena pesada del anticuerpo AT12-023, AT12-025, AT13-031, AT13-033, AT13-035 o AT13-036, y la secuencia codificadora variable de cadena ligera del mismo anticuerpo, o secuencias que son al menos el 80 %, con mayor preferencia al menos el 85 %, con mayor preferencia al menos el 86 %, con mayor preferencia al menos el 87 %, con mayor preferencia al menos el 88 %, con mayor preferencia al menos el 89 %, con mayor preferencia al menos el 90 %, con mayor preferencia al menos el 91 %, con mayor preferencia al menos el 92 %, con mayor preferencia al menos el 93 %, con mayor preferencia al menos el 94 %, con mayor preferencia al menos el 95 %, con mayor preferencia al menos el 96 %, con mayor preferencia al menos el 97 %, con mayor preferencia al menos el 98 %, con mayor preferencia al menos el 99 %, idéntico a ellas.

En algunas modalidades, se proporcionan vectores y moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una parte funcional de este de acuerdo con la invención. Por lo tanto, se proporciona además una molécula de ácido nucleico, o uno o más vectores, que codifica(n) el anticuerpo AT12-023, AT12-025, AT13-031, AT13-033, AT13-035 o AT13-037, o una parte funcional de estos. En algunas modalidades, dicha molécula de ácido nucleico o vector(es) se optimiza(n) en codones para un sistema de expresión recombinante no humano.

Se proporciona, además, un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Como se usa en la presente, un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención se denomina además como "un vector de acuerdo con la invención". Estos términos abarcan uno o más vectores de acuerdo con la invención, que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Como se usa en la presente, el término singular "un" abarca el término "uno o más".

Los métodos para construir vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención se conocen bien en la técnica. Ejemplos no limitantes de vectores adecuados para generar un vector de la invención son los vectores retrovirales y lentivirales. Dichos vectores son adecuados para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, uno o más vectores de la invención que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos beneficiosos terapéuticamente de acuerdo con la invención es/son adecuados para aplicaciones profilácticas o terapéuticas contra la AML. La administración de dicho(s) vector(es) a un individuo, preferentemente un humano, que necesita de esto, da como resultado la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico profiláctica o terapéutica *in vivo*, lo que da como resultado al menos un tratamiento o profilaxis parcial contra la AML. Dicho(s) vector(es) puede(n) usarse, además, en aplicaciones que involucran la expresión *in vitro* de una molécula de ácido nucleico de interés, por ejemplo para la producción (comercial) de anticuerpos o equivalentes funcionales de acuerdo con la invención. Por lo tanto, se proporciona además una célula aislada o recombinante, o un animal no humano, que comprende al menos una molécula de ácido nucleico o al menos un vector, de acuerdo con la invención.

Una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención es útil particularmente para generar anticuerpos o partes funcionales de estos de acuerdo con la invención, que son específicos para la AML. Esto se realiza, por ejemplo, mediante la introducción de dicha molécula de ácido nucleico o vector(es) en una célula de modo que la maquinaria de traducción de ácidos nucleicos de la célula produzca los anticuerpos o las partes funcionales codificadas. En una modalidad, una molécula de ácido nucleico o vector que codifica una cadena pesada y/o ligera de acuerdo con la invención se expresa en las llamadas células productoras, tales como, por ejemplo, células de *E. coli*, CHO, NSO o 293(T), algunas de las cuales se adaptan a la producción comercial de anticuerpos. Es de destacar que cualquier sistema de producción de anticuerpos recombinantes es adecuado; los cuatro sistemas celulares productores mencionados son solo algunos ejemplos de los muchos sistemas disponibles hasta la fecha. Como se describió anteriormente en la presente descripción, en dichos casos se prefiere usar moléculas de ácido nucleico en donde las secuencias humanas originales que se proporcionan en la presente descripción se optimizan en codones para la célula productora. La proliferación de dichas células productoras da como resultado una línea celular productora capaz de producir compuestos de unión de acuerdo con la invención. Preferentemente, dicha línea celular productora es adecuada para producir anticuerpos para su uso en seres humanos. Por lo tanto, dicha línea celular productora está libre preferentemente de agentes patógenos tales como microorganismos patógenos. Con la máxima preferencia, los anticuerpos que consisten de secuencias humanas se generan mediante el uso de al menos una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, se proporciona además una célula productora de anticuerpos aislados o recombinantes capaz de producir un compuesto de unión de acuerdo con la invención. Dicha célula comprende típicamente al menos una molécula de ácido nucleico o vector de acuerdo con la invención, que contiene preferentemente una secuencia de ácido nucleico que

se optimiza en codones para dicha célula. Una célula productora de anticuerpos se define en la presente descripción como una célula que es capaz de producir y/o secretar anticuerpos o partes funcionales de estos, y/o que es capaz de convertirse en una célula que es capaz de producir y/o secretar anticuerpos o partes funcionales de estos. Una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la invención es preferentemente una célula productora que se adapta a la producción comercial de anticuerpos. Como se explicó anteriormente, dicha célula productora es adecuada preferentemente para producir anticuerpos para su uso en seres humanos. Por lo tanto, se proporciona además un método para producir un anticuerpo o parte funcional de acuerdo con la invención, dicho método comprende proporcionar una célula, preferentemente una célula productora de anticuerpos, con una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención, y permitir que dicha célula traduzca dicha molécula de ácido nucleico o vector, lo que produce de esta manera dicho anticuerpo o parte funcional de acuerdo con la invención. Un método de acuerdo con la invención comprende además, preferentemente, una etapa de cosecha, purificación y/o aislamiento de dicho anticuerpo o parte funcional de acuerdo con la invención. Los compuestos de unión obtenidos de acuerdo con la invención se usan preferentemente en terapia humana, opcionalmente después de etapas adicionales de purificación, aislamiento o procesamiento.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo o parte funcional de acuerdo con la invención, que se acopla a otro compuesto. En una modalidad, se acopla a otro resto terapéutico, tal como un fármaco quimioterapéutico u otro compuesto tóxico o compuesto radiactivo, para formar el denominado "conjugado anticuerpo-fármaco". En otra modalidad, un resto que se acopla a un compuesto de unión de acuerdo con la invención es una molécula inmunomoduladora tal como, por ejemplo, un anticuerpo específico para CD3. Dicho anticuerpo específico para CD3 es capaz de unirse a las células T y, si se acopla a un compuesto de unión de acuerdo con la invención, dirigirá las células T a las células de AML, lo que potencia de esta manera una respuesta de células T contra la leucemia. Esto proporciona un efecto contra la AML aún más fuerte. Por lo tanto, una modalidad preferida de la invención proporciona un compuesto de unión biespecífico o multiespecífico, que comprende un compuesto de unión específico para la AML de acuerdo con la presente invención y una molécula inmunomoduladora, preferentemente un compuesto de unión específica para CD3. Otra modalidad preferida proporciona un compuesto contra la AML, dicho compuesto comprende un compuesto de unión de acuerdo con la presente invención, que es específico para las células de AML, y un resto tóxico. En algunas otras modalidades, un compuesto de unión de acuerdo con la presente invención se acopla a un marcador. Esto permite la detección de células mieloproliferativas, tales como las células de AML, mediante el uso de dicho compuesto de unión marcado. Otras modalidades proporcionan un compuesto de unión de acuerdo con la invención que se acopla a otro compuesto de unión a AML. En algunas modalidades, dicho otro compuesto de unión a AML también es un compuesto de unión de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, se proporciona un compuesto que comprende dos compuestos de unión de acuerdo con la invención que se acoplan entre sí. Sin embargo, esto no es necesario ya que un compuesto de unión de acuerdo con la invención también puede acoplarse a otros compuestos de unión a AML, tales como los anticuerpos conocidos actualmente que se unen a las células de AML. Los compuestos biespecíficos de acuerdo con la invención permiten, por ejemplo, un aumento de la unión de células de AML, especialmente cuando los dos compuestos de unión acoplados son específicos para epítomos diferentes en las células de AML. Dicho compuesto biespecífico es, por lo tanto, muy adecuado para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Además, es posible usar compuestos biespecíficos de acuerdo con la invención en ensayos en donde diferentes células de AML se unen al mismo compuesto de unión biespecífico.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo sintético o recombinante, o una parte funcional de este, que comprende un fragmento Fab de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, y un fragmento Fab de otro anticuerpo de acuerdo con la invención. El compuesto de unión resultante es específico para las células de AML, pero cada brazo Fab se unirá típicamente a su propio epítomo. En algunas modalidades, los epítomos reconocidos por los fragmentos Fab son diferentes entre sí. En otra modalidad, los epítomos son los mismos. Los brazos Fab pueden unirse a los epítomos con afinidad diferente. Alternativamente, los brazos Fab se unen a sus epítomos con esencialmente la misma afinidad, lo que significa que las K_D de los brazos Fab difieren no más del 30 %, preferentemente no más del 20 % o no más del 10 % entre sí.

Dicho otro resto, por ejemplo un agente quimioterapéutico o un anticuerpo específico para CD3, se acopla preferentemente a un compuesto de unión de acuerdo con la invención mediante un enlazador tal como, por ejemplo, un enlazador de hidrazona lábil en ácido, o mediante un enlazador peptídico como citrulina-valina, o mediante un enlace tioéter, o por transamidación catalizada por sortasa, que se describe en detalle en el documento WO 2010/087994.

La transamidación catalizada por sortasa implica el diseño por ingeniería de un sitio de reconocimiento de sortasa (LPETGG) en la cadena pesada de un anticuerpo, preferentemente en la parte C-terminal de la cadena pesada, y en el resto a acoplarse a dicho anticuerpo. El anticuerpo y el resto contienen además típicamente una secuencia GGGGS y una etiqueta para propósitos de purificación, tal como una etiqueta HIS. Subsecuentemente, se realiza la transamidación mediada por sortasa, seguida de un enlace por química clic. En una transaminidación catalizada por sortasa, el "enlace por química clic" involucra típicamente el acoplamiento químico de, por ejemplo, un reactivo que contiene alquino y, por ejemplo, un reactivo que contiene azida, el cual se añade mediante sortasa a través de la adición de glicinas al motivo sortasa en la cadena pesada del anticuerpo y a un motivo sortasa en el resto (tal como una proteína, péptido o anticuerpo) a acoplarse al anticuerpo. En una modalidad, la invención proporciona, por lo tanto, un anticuerpo de acuerdo con la invención en donde un sitio de reconocimiento de sortasa (LPETGG) se diseña por ingeniería en la cadena pesada del

anticuerpo, preferentemente en la parte C-terminal de la cadena pesada, el anticuerpo contiene preferentemente además una secuencia GGGGS y una etiqueta de purificación, tal como una etiqueta HIS.

5 En otra modalidad, un compuesto de unión de acuerdo con la invención se acopla a otro resto mediante un enlace tioéter. En tal caso, se incorporan preferentemente una o más cisteínas en un compuesto de unión de acuerdo con la invención. Las cisteínas contienen un grupo tiol y, por lo tanto, la incorporación de una o más cisteínas en un compuesto de unión de acuerdo con la invención, o el reemplazo de uno o más aminoácidos por una o más cisteínas de un compuesto de unión de acuerdo con la invención, permite el acoplamiento de dicho compuesto de unión a otro resto. Dichas una o más cisteínas se introducen preferentemente en un compuesto de unión de acuerdo con la invención en una posición en la que no influye significativamente en el plegado de dicho compuesto de unión, y no altera significativamente la unión a antígeno o la función efectora. Por lo tanto, la invención proporciona además un compuesto de unión de acuerdo con la invención, en donde al menos un aminoácido distinto de la cisteína se ha reemplazado por una cisteína.

15 En una modalidad, un compuesto de unión específico para la AML de acuerdo con la presente invención se acopla a al menos otro compuesto de unión específico para la AML de acuerdo con la presente invención. Dicho compuesto de unión biespecífico o multispecífico proporciona un efecto contra la AML más fuerte.

20 Los compuestos de unión de acuerdo con la presente invención son adecuados para su uso contra trastornos mieloproliferativos tales como la AML, o leucemias agudas que se desarrollaron a partir de síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide crónica, mielofibrosis u otros síndromes mieloproliferativos no malignos. Como algunos de los anticuerpos se unen, además, a neoplasias malignas linfoproliferativas no mieloides tales como el mieloma múltiple y el linfoma no Hodgkin B (B-NHL), también son adecuados para su uso contra estos trastornos. Los compuestos de unión de acuerdo con la presente invención son, por lo tanto, adecuados particularmente para su uso como un medicamento o agente profiláctico. Preferentemente, se usan compuestos de unión de acuerdo con la invención los cuales consisten de secuencias humanas, para reducir la posibilidad de efectos secundarios adversos cuando se tratan individuos humanos. Dichas secuencias humanas pueden aislarse a partir de un humano o producirse de forma sintética o recombinante basado en la secuencia de anticuerpos humanos, opcionalmente mediante el uso de secuencias de ácidos nucleicos optimizadas en codón que codifican los mismos aminoácidos que la secuencia de ácidos nucleicos humana original. Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento y/o agente profiláctico. Dicho anticuerpo comprende preferentemente un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AT12-023, AT12-025, AT13-031, AT13-033, AT13-035 y AT13-037. Además, se proporciona una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención que comprende dicho ácido nucleico, o una célula de acuerdo con la invención, para su uso como un medicamento y/o agente profiláctico. Cuando se administra(n) (un vector que comprende) una o más moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, la(s) molécula(s) de ácido nucleico se traducirá(n) *in situ* por la maquinaria del huésped en un compuesto de unión de acuerdo con la invención. Los compuestos de unión producidos de acuerdo con la invención son capaces de prevenir y/o contrarrestar trastornos mieloproliferativos tales como la AML y trastornos linfoproliferativos tales como, por ejemplo, linfoma, B-NHL y mieloma múltiple. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo o parte funcional o equivalente funcional de acuerdo con la invención, o una molécula de ácido nucleico o equivalente funcional de acuerdo con la invención, o un vector o una célula de acuerdo con la invención, para su uso en un método para al menos en parte tratar o prevenir la leucemia mieloide (AML) o el linfoma no Hodgkin B (B-NHL). Como se describió anteriormente en la presente descripción, dicho trastorno puede tratarse o prevenirse mediante el uso de compuestos de unión citotóxicos de acuerdo con la invención. Como se demuestra en los Ejemplos, al menos los anticuerpos AT13-033, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT12-023, AT12-025 y AT13-031 tienen actividad citotóxica. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos AT13-033, AT13-035, AT13-037, AT12-023, AT12-025 y AT13-031, y partes funcionales de estos, o una molécula de ácido nucleico o uno o más vectores que los codifican, para su uso en un método para al menos en parte tratar o prevenir la AML o el B-NHL. Preferentemente, dicho trastorno es AML.

50 En algunas modalidades, un compuesto de unión de acuerdo con la invención se acopla a un resto terapéutico, tal como un fármaco quimioterapéutico u otro compuesto tóxico o un compuesto radioactivo o una molécula inmunomoduladora tal como, por ejemplo, un anticuerpo específico para CD3, para formar un denominado "conjugado anticuerpo-fármaco" o una "célula T del receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés)", respectivamente, que puede contrarrestar un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo.

55 En algunas modalidades, dicho trastorno linfoproliferativo se trata con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en los anticuerpos AT12-023, AT12-025 y AT13-031, y partes funcionales de estos. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos AT12-023, AT12-025 y AT13-031, y partes funcionales de estos, o una molécula de ácido nucleico o uno o más vectores que los codifican, por lo tanto, para su uso en un método para al menos en parte tratar o prevenir la AML o el B-NHL.

60 Un compuesto de unión de acuerdo con la invención, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o al menos un vector o célula de acuerdo con la invención, se usa preferentemente para al menos en parte tratar y/o prevenir la AML. Como se usa en la presente, el término "al menos en parte tratar y/o prevenir la AML" incluye contrarrestar el crecimiento del tumor de la AML y/o aliviar los síntomas que resultan de la presencia de células de AML en un paciente. Por lo tanto, se proporciona además el uso de un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, o de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o de al menos un vector o célula de acuerdo con la invención,

para la preparación de un medicamento y/o agente profiláctico para al menos en parte tratar y/o prevenir la AML. Además, se proporciona un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o al menos un vector o célula de acuerdo con la invención, para su uso en un método para al menos en parte tratar y/o prevenir la AML.

5

Los anticuerpos preferidos para su uso en cualquiera de los métodos citados son los anticuerpos AT12-023, AT12-025, AT13-031, AT13-033, AT13-035 y AT13-037.

10

La invención proporciona, además, una composición que comprende un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención. Además, se proporciona una composición que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, así como también una composición que comprende un vector o una célula de acuerdo con la invención. En algunas modalidades, una composición de acuerdo con la invención comprende al menos dos anticuerpos o partes funcionales de estos de acuerdo con la invención.

15

Una composición de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica comprende además preferentemente un portador, diluyente y/o excipiente aceptable farmacéuticamente. Los ejemplos no limitantes de portadores adecuados comprenden, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés), albúmina sérica (por ejemplo, BSA o RSA) y ovoalbúmina. En una modalidad preferida, dicho portador adecuado comprende una solución, como, por ejemplo, solución salina. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es adecuada preferentemente para uso humano.

20

25

La invención describe además un método para al menos en parte tratar y/o prevenir un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo, que comprende administrar a un individuo que necesita de esto una cantidad eficaz terapéuticamente de un anticuerpo o parte funcional o equivalente funcional de acuerdo con la invención, y/o una molécula de ácido nucleico o equivalente funcional de esta de acuerdo con la invención, y/o un vector o célula de acuerdo con la invención, y/o una composición de acuerdo con la invención. Como se usa en la presente, un "individuo" o "sujeto" es un ser humano o un animal, preferentemente un paciente humano con AML. Dicha composición es preferentemente una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

30

Un compuesto y/o composición de unión de acuerdo con la presente invención es adecuado particularmente para administrar a individuos inmunocomprometidos con un riesgo aumentado de complicaciones, tales como individuos que se han sometido a quimioterapia, particularmente niños y personas mayores. Un compuesto de unión, o una molécula de ácido nucleico, o un vector, y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra preferentemente mediante una o más inyecciones. Las dosis típicas de administración de un compuesto de unión de acuerdo con la invención están entre 0,1 y 10 mg por kg de peso corporal.

35

40

Un compuesto de unión de acuerdo con la invención es, además, adecuado particularmente para uso diagnóstico. Por ejemplo, si se sospecha que un individuo, preferentemente un ser humano, padece un trastorno mieloproliferativo tal como la AML o un trastorno linfoproliferativo tal como el B-NHL o el mieloma múltiple, una muestra, tal como una muestra de sangre o tejido de dicho individuo, puede probarse para la presencia de células mieloproliferativas o células linfoproliferativas, mediante el uso de un compuesto de unión de acuerdo con la invención. Preferentemente, dicha muestra se mezcla con un compuesto de unión de acuerdo con la invención, que se unirá específicamente a las células mieloproliferativas. Las células mieloproliferativas o las células linfoproliferativas unidas a un compuesto de unión de acuerdo con la invención pueden aislarse de la muestra y/o detectarse mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, pero sin limitarse a, el aislamiento mediante el uso de perlas magnéticas, perlas recubiertas con estreptavidina, o el aislamiento mediante el uso de anticuerpos secundarios inmovilizados en una columna. Alternativamente, o adicionalmente, un compuesto de unión de acuerdo con la invención se marca para poder detectar dicho anticuerpo, por ejemplo, pero sin limitarse a, se marca con fluorescencia, se marca enzimáticamente o se marca radiactivamente. Alternativamente, un compuesto de unión de acuerdo con la invención se detecta mediante el uso de un anticuerpo secundario marcado que se dirige contra dicho compuesto de unión. Si se detecta la unión de dicho anticuerpo, esto indica la presencia de células mieloproliferativas o linfoproliferativas. Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o un vector o una célula de acuerdo con la invención, para su uso en la detección de células de AML o B-HNL. Además, se proporciona un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o un vector o una célula de acuerdo con la invención, para su uso en el diagnóstico de la AML o el B-HNL. Las células linfoproliferativas se detectan preferentemente con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en AT12-023, AT12-025 y AT13-031, y partes funcionales de estos.

50

55

60

Además, se proporciona el uso de un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, o el uso de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o el uso de un vector o una célula de acuerdo con la invención, para determinar si una muestra comprende células de AML o B-HNL, así como también un método para detectar células de AML o B-HNL mediante el uso de un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención. La invención proporciona, además, un método para determinar si las células de AML o B-HNL están presentes en una muestra, que comprende:

65

- poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, y

- permitir que dicho anticuerpo o parte funcional se una a las células mieloproliferativas o linfoproliferativas, si están presentes, y
- determinar si las células de AML o B-NHL se unen o no a dicho anticuerpo o parte funcional, lo que determina de esta manera si las células de AML o B-NHL están o no presentes en dicha muestra.

5

En una modalidad preferida, dichas células mieloproliferativas son células de AML. En otra modalidad preferida, dichas células linfoproliferativas son de B-NHL. Las células linfoproliferativas se detectan preferentemente con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en AT12-023, AT12-025 y AT13-031, y partes funcionales de estos.

10

En una modalidad se refiere a determinar si un individuo padece un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo. Además, se proporciona un método para determinar si un individuo padece un trastorno mieloproliferativo o un trastorno linfoproliferativo, en donde dicho trastorno mieloproliferativo es AML y en donde dicho trastorno linfoproliferativo es linfoma no Hodgkin B, que comprende:

15

- poner en contacto una muestra de dicho individuo con un anticuerpo o una parte funcional de este de acuerdo con la invención, y
- permitir que dicho anticuerpo o parte funcional se una a las células mieloproliferativas o linfoproliferativas, si están presentes, y

20

- determinar si las células mieloproliferativas o las células linfoproliferativas se unen o no a dicho anticuerpo o parte funcional o equivalente funcional, lo que determina de esta manera si dicho individuo padece o no un trastorno mieloproliferativo o un trastorno linfoproliferativo. Preferentemente, dicho individuo es un ser humano. En algunas modalidades, dicho trastorno mieloproliferativo es AML. En otras modalidades, dicho trastorno linfoproliferativo es linfoma, B-NHL o mieloma múltiple.

25

Como se describió anteriormente en la presente descripción, la presente invención proporciona la sorprendente revelación de que el snRNP200 está presente en la superficie de las células de AML, en tanto que normalmente el snRNP200 se localiza solo en el núcleo. Por lo tanto, el snRNP200 es un objetivo importante para la terapia contra la AML. Además, los anticuerpos AT12-023 y AT13-031, que son específicos para el snRNP200, también se unen a las células de B-NHL y a las células de mieloma múltiple. Esto indica que la expresión superficial del snRNP200 también se produce en células de B-NHL y en células de mieloma múltiple. Ahora que se ha proporcionado esta revelación, se hacen posibles muchas aplicaciones. Por ejemplo, los compuestos de unión específicos para el snRNP200 ahora pueden usarse para tratar o prevenir trastornos mieloproliferativos o linfoproliferativos. Por lo tanto, se describe el uso de un compuesto de unión específico para el snRNP200 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo, tal como la AML, el B-NHL o el mieloma múltiple. Además, se describe un compuesto de unión específico para el snRNP200 para su uso en un método para al menos en parte tratar o prevenir un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo, así como también un método para al menos en parte tratar y/o prevenir un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo, que comprende administrar a un individuo que necesita de esto una cantidad eficaz terapéuticamente de un compuesto de unión específico para el snRNP200.

40

Se dispone además de nuevos métodos de detección. Como el snRNP200 está presente normalmente solo en el núcleo, pero parece además estar presente en la superficie de las células mieloproliferativas y linfoproliferativas, estas células ahora pueden detectarse y distinguirse de las células sanas al determinar si el snRNP200 está presente en su superficie. Además, se describe un método para determinar si una célula mielóide o una célula linfóide es una célula mieloproliferativa o una célula linfoproliferativa, el método comprende determinar si el snRNP200 está presente en la superficie de dicha célula, en donde la presencia del snRNP200 en la superficie de dicha célula indica si dicha célula es mieloproliferativa o linfoproliferativa. Además, se describe un método para identificar células mieloproliferativas o linfoproliferativas, que comprende detectar la presencia del snRNP200 sobre la superficie de dichas células. Como se usa en la presente, la expresión "presente en la superficie de una célula" o "presente sobre la superficie de una célula" significa que al menos parte del snRNP200 está presente en, o dentro de, la superficie de la célula, o asociada con la misma.

50

En algunas modalidades, se tipifica una muestra de un individuo que contiene células. Dicha muestra, que contiene típicamente células linfoides y/o células mieloides, se prueba en algunas modalidades para detectar la presencia del snRNP200 sobre la superficie de estas células. Si el snRNP200 parece estar presente sobre la superficie de las células, la muestra se tipifica como que contiene células mieloproliferativas o linfoproliferativas. Por lo tanto, se proporciona además un método para tipificar una muestra que contiene células mieloides o una muestra que contiene células linfoides de un individuo, el método comprende determinar si el snRNP200 está presente sobre la superficie de las células de dicha muestra. Si este es el caso, indica que en dicha muestra están presentes células mieloproliferativas o linfoproliferativas.

60

En algunas modalidades, el individuo padece de, o se sospecha que padece, un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo. Sin embargo, esto no es necesario, ya que dicho método de tipificación puede ser parte, además, de una prueba de detección general, por ejemplo, para controles de salud.

Dicha muestra puede ser cualquier muestra que contenga células mieloides y/o linfoides, tal como, por ejemplo, una muestra de médula ósea, una muestra de tejido o una muestra de fluido linfático. Preferentemente, dicha muestra

comprende células mononucleares de sangre periférica, ya que una muestra de sangre puede obtenerse fácilmente con poca incomodidad para el individuo.

5 La presente invención proporciona la revelación de que al menos una subpoblación de pacientes que padecen un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo produce anticuerpos que son específicos para el snRNP200. La presencia de dichos anticuerpos en una muestra de un individuo es, por lo tanto, indicativa de un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo. Por lo tanto, se proporciona además un método para determinar si un individuo padece un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo, en donde dicho trastorno mieloproliferativo es AML y en donde dicho trastorno linfoproliferativo es linfoma no Hodgkin B, y comprende determinar si una muestra de dicho individuo comprende anticuerpos que son específicos para el snRNP200. En algunas modalidades, dicho método comprende las etapas de:

- poner en contacto una muestra de dicho individuo con el snRNP200 o un epítipo de este;
- permitir que dicho snRNP200 o epítipo se una a anticuerpos específicos para el snRNP200 de dicha muestra, si están presentes, y
- 15 • determinar si dicho snRNP200 o epítipo se une o no a los anticuerpos específicos para el snRNP200, en donde la unión de dicho snRNP200 o epítipo a los anticuerpos específicos para el snRNP200 indica que dicho individuo padece un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo.

20 Los ensayos de detección, tal como se proporcionan en la presente descripción, pueden realizarse mediante el uso de métodos tales como, por ejemplo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), radioinmunoensayos (RIA, por sus siglas en inglés), ensayos de transferencia de Western y ensayos de tinción inmunohistoquímica. Estos ensayos se conocen bien en la técnica y, por lo tanto, no necesitan explicación adicional. Las variaciones o adaptaciones de ELISA, RIA, ensayo de transferencia de Western y ensayo de tinción inmunohistoquímica también se conocen en la técnica.

25 Otro aspecto de la invención proporciona un método para determinar si un paciente que padece un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo tiene una probabilidad mejorada de un resultado positivo del tratamiento con un anticuerpo o una parte funcional específica para el snRNP200, en comparación con la población media de pacientes que padecen un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo, el método comprende determinar si el snRNP200 está presente en la superficie de las células mieloproliferativas o células linfoproliferativas de dicho paciente. Si este es el caso, los anticuerpos específicos para el snRNP200, tales como AT12-023, AT13-031 y AT13-037, son adecuados particularmente para contrarrestar dicho trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo. Por lo tanto, si se conoce que las células mieloproliferativas o linfoproliferativas de un individuo expresan el snRNP200 en su superficie, la posibilidad de un tratamiento exitoso aumenta. Un método de acuerdo con la invención comprende las etapas de:

- poner en contacto una muestra que contiene células mieloproliferativas o células linfoproliferativas de dicho individuo con un anticuerpo o parte funcional que es específico para el snRNP200;
- permitir que dicho anticuerpo o parte funcional se una a las células mieloproliferativas o células linfoproliferativas de dicha muestra, y
- 40 • determinar si dicho anticuerpo o parte funcional específica para el snRNP200 se une o no a células mieloproliferativas o células linfoproliferativas de dicha muestra, en donde la unión de dicho anticuerpo o parte funcional específico para el snRNP200 a células mieloproliferativas o células linfoproliferativas de dicha muestra, indica que dicho paciente tiene una posibilidad mejorada de un resultado positivo del tratamiento con un anticuerpo o parte funcional, en comparación con la población media de pacientes que padecen un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo, en donde dicho trastorno mieloproliferativo es AML y en donde dichas células mieloproliferativas son células de AML, o en donde dicho trastorno linfoproliferativo es linfoma no Hodgkin B y en donde dichas células linfoproliferativas son células de linfoma no Hodgkin B. Dicho tratamiento comprende preferentemente el uso de anticuerpos AT12-023, AT13-031 o AT13-037, o partes funcionales de estos, ya que al menos estos anticuerpos son capaces de unirse al snRNP200.

50 Si se contempla el uso del anticuerpo AT12-023, AT13-031 y/o AT13-037, se determina preferentemente de antemano si un determinado paciente contiene células malignas que expresan el snRNP200 en su superficie. Por lo tanto, algunas modalidades proporcionan un método para determinar si un paciente que padece un trastorno mieloproliferativo o un trastorno linfoproliferativo es un candidato para el tratamiento con el anticuerpo AT12-023, AT13-031 o AT13-037, o una parte funcional o un equivalente funcional de este, el método que comprende determinar si el snRNP200 está presente sobre la superficie de las células mieloproliferativas o linfoproliferativas de dicho paciente.

60 En un método de acuerdo con la invención, dicho trastorno mieloproliferativo es preferentemente AML y dichas células mieloproliferativas son preferentemente células de AML. Además, dicho trastorno linfoproliferativo es preferentemente linfoma, linfoma no Hodgkin B o mieloma múltiple y dichas células linfoproliferativas son preferentemente células de linfoma, linfoma no Hodgkin B o mieloma múltiple.

65 Los procedimientos mencionados anteriormente para detectar células mieloproliferativas o linfoproliferativas mediante el uso de compuestos de unión son, por ejemplo, adecuados particularmente para determinar si un paciente que padece un trastorno mieloproliferativo o un trastorno linfoproliferativo que ha recibido tratamiento médico, tal como, por ejemplo, un paciente con AML que ha recibido tratamiento contra la AML, por ejemplo, un paciente de AML que ha recibido

inmunoterapia, tal como un trasplante de células madre o una infusión de linfocitos de donantes, tiene una respuesta GvL. Hasta la fecha, no existen herramientas de diagnóstico para probar la presencia de una respuesta GvL potente en un paciente tratado. Dicha herramienta de diagnóstico es muy necesaria, por ejemplo, porque: 1) permitirá la identificación temprana de receptores de SCT alogénicos con riesgo alto de recaída, en un punto temporal antes de que se produzca la recaída, lo que permite de esta manera intervenciones más tempranas, tal como la disminución de los inmunosupresores o de las infusiones de linfocitos de donantes; 2) permitirá la valoración de dichas infusiones de linfocitos del donante hasta que aparezcan anticuerpos anti-leucemia; y 3) ofrecerá esperanza para los receptores de SCT alogénicos en un momento en el que a menudo padecen una de las muchas complicaciones relacionadas con el SCT cuando puede demostrarse la presencia de una respuesta GvL potente. Hoy en día, los pacientes tienen que esperar y ver si se produce o no una recaída, y no existe manera de predecir la recaída de la enfermedad. Por lo tanto, la disponibilidad de una prueba para determinar si un paciente tiene una respuesta GvL mejorará en gran medida la atención clínica de los pacientes con SCT, lo que afecta el pronóstico y la calidad de vida. Se proporciona por lo tanto, además, el uso de un compuesto de unión de acuerdo con la invención para determinar si una muestra es indicativa de una respuesta GvL. Además, se proporciona el uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para determinar si un paciente con AML tiene o no una respuesta GvL. Además, se describe el uso de un compuesto de unión de acuerdo con la invención para determinar si un tratamiento contra una enfermedad mieloproliferativa o linfoproliferativa, tal como, por ejemplo, una terapia contra la AML, una terapia contra el B-NHL o una terapia contra el mieloma múltiple, es eficaz. Esto se realiza, por ejemplo, al determinar si una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre o tejido) de un paciente (que, por ejemplo, ha recibido un SCT o DLI o cualquier otra forma de inmunoterapia) contiene células mieloproliferativas o linfoproliferativas, por ejemplo células de AML, células de B-NHL o células de mieloma múltiple. La ausencia de células mieloproliferativas o linfoproliferativas indica que dicho paciente tiene una respuesta GvL. Se proporciona por lo tanto, además, un método para determinar si un paciente que padece un trastorno mieloproliferativo o un trastorno linfoproliferativo que ha recibido inmunoterapia contra dicho trastorno tiene una respuesta GvL, el método comprende poner en contacto una muestra de dicho paciente con un anticuerpo o una parte funcional de este de acuerdo con la invención, y permitir que dicho anticuerpo o parte funcional se una a las células mieloproliferativas o linfoproliferativas, si están presentes, y determinar si las células mieloproliferativas o las células linfoproliferativas se unen o no a dicho anticuerpo o parte funcional o equivalente funcional, lo que determina de esta manera si el individuo tiene una respuesta GvL, por lo que la ausencia de células mieloproliferativas o linfoproliferativas es indicativa de una respuesta GvL y la presencia de células mieloproliferativas o linfoproliferativas es indicativa de la falta de, o de una insuficiente (ineficaz), respuesta GvL. En algunas modalidades, dicho trastorno linfoproliferativo es linfoma, B-NHL o mieloma múltiple. En algunas modalidades, dicho trastorno mieloproliferativo es AML. Se proporciona por lo tanto, además, un método para determinar si un paciente con AML que ha recibido inmunoterapia contra la AML tiene una respuesta GvL, el método comprende poner en contacto una muestra de dicho paciente con AML con un anticuerpo o una parte funcional o equivalente funcional de acuerdo con la invención, y permitir que dicho anticuerpo o parte funcional se una a las células de AML, si están presentes, y determinar si las células de AML se unen a dicho anticuerpo o parte funcional o equivalente funcional, lo que determina de esta manera si dicho individuo tiene o no una respuesta GvL, de manera que la ausencia de células de AML es indicativa de una respuesta GvL y la presencia de la respuesta de AML es indicativa de la falta de, o de una insuficiente (ineficaz), respuesta GvL. Preferentemente, dicho individuo es un ser humano. Alternativamente, los compuestos de unión de acuerdo con la presente invención que se marcan con un resto detectable, tal como por ejemplo con un compuesto de cobre, se administran a un paciente con AML que ha recibido inmunoterapia contra la AML tal como un SCT o DLI, y se determina subsecuentemente si dicho anticuerpo marcado se une a las células de AML de dicho paciente *in vivo*, por ejemplo, mediante el uso de una exploración PET. La ausencia de compuestos de unión unidos es indicativa de una respuesta GvL y la presencia de compuestos de unión unidos es indicativa de la falta de, o de una insuficiente (ineficaz), respuesta GvL.

Además, es posible determinar la cantidad de anticuerpo que pertenece a la familia VH4-34 antes y después de la inmunoterapia contra la AML. Si la cantidad de anticuerpo que pertenece a la familia VH4-34, que es una familia de secuencias VH conocida por sus propiedades de destrucción potenciales (Bhat y otros, 1997), se incrementa significativamente después de la inmunoterapia, esto indica que existe una respuesta GvL. Además, se describe, por lo tanto, un método para determinar si un paciente con AML que ha recibido inmunoterapia contra la AML tiene una respuesta GvL, el método comprende determinar la cantidad de anticuerpo que pertenece a la familia VH4-34 antes y después de la inmunoterapia contra la AML, y determinar si la cantidad de anticuerpo que pertenece a la familia VH4-34 aumenta significativamente después de la inmunoterapia. Si este es el caso, se concluye que está presente una respuesta GvL en dicho paciente. Si este no es el caso, se concluye que falta una respuesta GvL, o que no es suficiente.

La invención se explica adicionalmente en los ejemplos siguientes. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que sirven simplemente para aclarar la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Secuencias de los anticuerpos AT12-023, AT12-025, AT13-024, AT12-019, AT13-022, AT13-023, AT13-031, AT12-020, AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT14-013, AT14-014, AT14-015 y AT14-016.

Figura 2. Paciente de 36 años de edad con AML, que obtuvo una remisión completa después del primer ciclo de quimioterapia de inducción y recibió un trasplante de células madre (SCT) alogénico mieloablativo (MA) de su hermano (her) HLA-compatible como terapia de consolidación. La recaída de la AML se produjo, sin embargo, 5 meses después

del trasplante. La quimioterapia de reinducción resultó nuevamente en una remisión completa y en una enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) grave de grado IV del hígado y GvHD de grado I de la piel. La observación de que ella ha permanecido en remisión completa durante más de tres años ahora implica que ha desarrollado una respuesta de injerto contra leucemia potente. Se aislaron linfocitos B de un producto de flebotomía obtenido aproximadamente 1,5 años después de un ciclo de quimioterapia de reinducción.

Figura 3. a) Unión del sobrenadante de uno de los minicultivos (20 o 40 células por pocillo) a la línea celular de AML THP-1. b) Las células B de este minicultivo se sembraron en placas en soluciones de 1 célula/pocillo y los sobrenadantes se examinaron nuevamente para determinar su unión a THP-1. La THP-1 expresa HLA-DR, que se usó en este experimento de tamizaje como control positivo. Como control negativo se usó un anticuerpo monoclonal específico para la influenza.

Figura 4. Dos ejemplos de los anticuerpos específicos para la AML identificados. AT12-023 (a) y AT13-031 (b) se unen a las líneas celulares de AML THP-1 y MonoMac6, pero no a células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sanas, células endoteliales (células endoteliales de vena umbilical humana: HUVEC), la línea de células T Jurkat, fibroblastos primarios, hepatocitos (línea celular de carcinoma hepatocelular hepático: HepG2) o la línea celular de adenocarcinoma de colon HT-29. El AcM F1 contra MRSA es un AcM IgG3 humano generado internamente que se usa como anticuerpo control.

Figura 5. Los anticuerpos derivados a partir del donante 59 se unen a las líneas celulares de AML THP-1 y MonoMac6, y a los blastos leucémicos primarios aislados de pacientes con AML diagnosticados recientemente (que varían desde la clasificación FAB M0-M4). Ver además la tabla 3 para una información general más detallada.

Figura 6. Algunos de los anticuerpos también se unen a otras neoplasias malignas hematológicas. Aquí, se muestra la unión del AT12-023 (anticuerpos aislados del sobrenadante del clon de células B) y el AT 13-031 (anticuerpo recombinante) a células de linfoma no Hodgkin B (B-NHL) que se aislaron recientemente a partir de un paciente con linfoma. Los anticuerpos no se unieron a células B no malignas (no se muestra en este experimento). El anticuerpo Palivizumab del RSV se usó como control negativo, y Rituximab, un anticuerpo CD20 que se une específicamente al linfoma de células B, como control positivo. Ver la tabla 4 para obtener más detalles sobre la unión del anticuerpo a otras neoplasias malignas hematológicas.

Figura 7. Las células THP-1 se cultivaron en medio solo o con anticuerpos añadidos a una concentración de 5 µg/ml en el día 0. En presencia de AT12-023, las células THP-1 mostraron una inhibición del crecimiento significativa. Se representan los números totales de células en cultivo.

Figura 8. Cuando se añadieron en el día 0 del cultivo, los anticuerpos AT12-023 y AT12-025 redujeron fuertemente la viabilidad de las células THP-1. La viabilidad se representa como la proporción de células doble negativas para los marcadores de muerte celular Anexina V y 7AAD.

Figura 9. Para cuantificar la cantidad de células THP-1 destruidas específicamente por AT12-023, se usó un ensayo de liberación de calceína AM. Brevemente, antes de que las células THP-1 se incubaran con AT12-023, las células THP-1 se cargaron con calceína AM, que se libera cuando las células están moribundas y la membrana celular se vuelve inestable. La lisis se leyó después de 4 horas de incubación y se relacionó con la muerte de referencia de células cargadas con calceína, medida con un anticuerpo irrelevante.

Figura 10.

1. a) Además de la destrucción de células THP-1, el AT12-025 induce además la muerte de células tumorales primarias, similar a AT13-024. Blastos leucémicos, aislados a partir de un paciente con AML-M5 en el momento del diagnóstico, se incubaron con AT12-025 o AT13-024 (5 µg/ml) durante 24 horas a 37 °C, después de lo cual las células se tiñeron con 7AAD y Anexina V para determinar la cantidad de células muertas (doble positivas para 7AAD y Anexina V).

2. b) Además, la lactato deshidrogenasa (LDH) puede usarse como un marcador para determinar las células moribundas. Los blastos leucémicos, aislados a partir de un paciente con AML-M0, se incubaron con AT13-024 o el anticuerpo Palivizumab del RSV durante 18 horas, después de lo cual se midió la liberación de LDH. Estos dos experimentos muestran que AT13-024, pero no el Palivizumab, indujo la muerte de blastos leucémicos y que esta propiedad no se restringe a un tipo de AML, sino que incluye diferentes clasificaciones FAB (M0 a M5).

Figura 11. La donante 58 se diagnosticó con AML-M5, por lo que recibió tres ciclos de quimioterapia. Permaneció en remisión completa durante aproximadamente un año, después de lo cual la AML recayó. Recibió un ciclo de quimioterapia de reinducción, seguido de un trasplante alogénico de células madre de intensidad reducida (RIST) de un donante compatible no relacionado (MUD, por sus siglas en inglés). Desarrolló una GvHD grado I del hígado y ha permanecido en remisión completa durante casi 4 años ahora, lo que implica que ha desarrollado una potente respuesta de injerto contra leucemia. Las células B se aislaron de un producto de flebotomía obtenido a partir de este paciente aproximadamente 3 años después del SCT.

Figura 12. Los anticuerpos derivados del donante 58 se unen a las líneas celulares de AML THP-1 y MonoMac6. Palivizumab, el anticuerpo específico para RSV disponible comercialmente, se usó como control negativo.

Figura 13. Historia clínica de un tercer paciente con una respuesta GvL potente. El donante 101 se diagnosticó con una AML de riesgo intermedio (sin anomalías citogenéticas o moleculares; clasificación FAB AML-M5) a la edad de 49 años. Recibió dos ciclos de quimioterapia y un ciclo de quimioterapia de consolidación, seguido de un HSCT autólogo, ya que no había un donante de células madre hermano HLA-compatible disponible. Catorce meses después del primer diagnóstico recayó de su enfermedad. Obtuvo una remisión completa después de un ciclo de citarabina a dosis alta, después de lo cual recibió un HSCT alogénico de intensidad reducida de un donante no relacionado compatible (RIST-MUD). Seis semanas después, desarrolló una GvHD aguda de piel, hígado e intestino (estadio 1; grado II) que respondió bien a la terapia con corticosteroides. Las células B se aislaron de un producto de flebotomía obtenido a partir de este paciente 38 meses después del HSCT alogénico. Ha mantenido una remisión duradera hasta hoy.

Figura 14. Los anticuerpos derivados a partir del donante 101 se unen a las líneas celulares de AML THP-1 y Molm13, pero no a fibroblastos, monocitos, células B y células T. Se usó un anticuerpo humano contra CD30 producido internamente como control negativo. El AT14-013 mostró una reactividad baja con los fibroblastos, en comparación con su unión alta a las líneas celulares de AML. Ver las tablas 7 y 8 para una información general de las capacidades de unión de los anticuerpos derivados a partir del donante 101.

Figura 15. El anticuerpo específico para la AML AT14-013 (donante 101) se une a los blastos leucémicos primarios aislados a partir de pacientes con AML diagnosticados recientemente (clasificaciones FAB M0-M5). Control negativo: anticuerpo CD30 generado internamente. Ver la tabla 7 para una información general de las capacidades de unión a blastos de AML primarios de los anticuerpos derivados a partir del donante 101.

Figura 16. El anticuerpo AT13-037 induce la muerte de los blastos primarios. Los blastos leucémicos, aislados a partir de un paciente con AML en el momento del diagnóstico (BL-038; AML-M5), se incubaron con anticuerpos purificados de los sobrenadantes del clon de células B parentales (sAT13-037) o con el anticuerpo recombinante (rAT13-037) a una concentración de 5 ug/ml durante 4 horas a 37 °C, después de lo cual las células se tiñeron con el marcador de muerte celular Dapi. Para cuantificar la muerte de las células se añadió una cantidad estándar de perlas. Se usó el rAT10-002 recombinante específico para la influenza como control negativo.

Figura 17. Los anticuerpos citotóxicos indujeron una vía de muerte no apoptótica. a) Obtención de imágenes por contraste de fase de células THP-1. Las células THP-1 se incubaron con el anticuerpo no citotóxico específico para la AML AT13-023 (panel izquierdo) o el anticuerpo citotóxico AT13-037 específico para la AML (panel derecho). La interacción se visualizó mediante el uso de obtención de imágenes de lapso de tiempo y demostró hinchazón de las células objetivo después de lo cual las células murieron. Se tomaron instantáneas después de 4 horas de incubación, con flechas azules que indican células grandes muertas. b) La doble tinción con DiOC6 y PI mostró que los anticuerpos citotóxicos no inducen apoptosis. Las células THP-1 se incubaron con el anticuerpo citotóxico específico para la AML AT12-023, con diclofenaco (que induce la apoptosis en células THP-1) o solo con medio. Las células que experimentan apoptosis primero pierden su potencial de membrana mitocondrial (pérdida de la tinción de DiOC6), después de lo cual se vuelven permeables (positivas a PI), como puede verse después de la incubación de las células THP-1 con diclofenaco. Las células THP-1 incubadas con AT12-023 mostraron un aumento de la permeabilidad de la membrana (PI+) pero mantuvieron el potencial de membrana mitocondrial (DioC6+), lo que indica la inducción de una vía de muerte celular no apoptótica. c) Para confirmar la naturaleza no apoptótica de la vía de muerte inducida, se probó la implicación de las caspasas en la inducción de la muerte celular. La muerte celular de las células THP-1 mediante los anticuerpos específicos para la AML no pudo prevenirse con los inhibidores de caspasas Q-VD-OPh (panel izquierdo) o Z-VAD-fmk (panel derecho).

Figura 18. La muerte celular inducida por anticuerpos específicos para la AML se produjo también a 4 °C, lo que sugiere la implicación de un proceso pasivo. Esto fue cierto para todos los anticuerpos, excepto para el AT13-031, que es citotóxico solo a 37 °C (no se muestra). Los controles negativos incluyeron los anticuerpos no citotóxicos específicos para la AML AT13-034, AT12-019, AT13-022, AT13-023 y AT13-024.

Figura 19. (a) La incubación de las células objetivo con citocalasina D no inhibió la unión de los anticuerpos. Las células THP-1 se incubaron con citocalasina D, después de lo cual se añadieron los anticuerpos específicos para la AML AT12-023, AT13-031 y AT13-037. (b) La preincubación de las células objetivo con el agente estabilizador de membrana citocalasina D protegió a las células THP-1 contra la muerte celular por los anticuerpos citotóxicos específicos para la AML.

Figura 20. Verificación de objetivo de AT12-023, AT13-031 y AT13-037. a) El lisado de membrana THP-1 se incubó con AT12-023 y AT13-031, con el anticuerpo específico para la influenza AT10-002 o solo con marcador. El análisis de transferencia Western que incluyó el snRNP200 antihumano de ratón (y HMGB1 como control negativo) reveló la unión específica de AT12-023 y AT13-031 al snRNP200. b) Los anticuerpos específicos para la AML AT12-019, AT12-023, AT13-031 y AT13-037 o anticuerpos específicos para snRNP200 disponibles comercialmente snRNP200 453 y snRNP200 454 se recubrieron sobre una placa ELISA, se incubaron con un constructo snRNP200-flag para la captura y con HRP anti-flag para la detección. AT12-023, AT13-031 y AT13-037 se unieron específicamente al snRNP200, mientras que los controles negativos y, por ejemplo, AT12-019, no lo hicieron.

Figura 21. Las células THP-1 expresan el snRNP200 sobre su membrana. Las células THP-1 y las células Jurkat se tiñeron con un anticuerpo anti-snRNP200 de ratón humano disponible comercialmente. La tinción intracelular de las células Jurkat y las células THP-1 mostró tinción nuclear, como se esperaba (paneles de la izquierda). Sin embargo, la tinción de membrana del snRNP200 se restringió a las células THP-1 (paneles de la derecha).

5

EJEMPLOS

Ejemplo 1

10 Materiales y métodos

Materiales de humanos sanos y pacientes

15 Los protocolos de estudio se aprobaron por el Comité de Ética Médica del Centro Médico Académico. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado. Se seleccionaron dos pacientes que habían recibido un trasplante alogénico de células madre (trasplante mieloablativo de hermano para el donante 59 y un trasplante de células madre de intensidad reducida de donante no relacionado compatible para el donante 58) para la AML y que, basado en sus historias clínicas, puede asumirse que han generado respuestas de injerto contra leucemia fuertes. Estos dos receptores de SCT donaron 500 ml de sangre periférica cada uno, los productos de una de las muchas flebotomías a las que se sometieron por hiperferritinemia posterior a la transfusión. Además, los pacientes admitidos en nuestra clínica con AML diagnosticada recientemente consintieron en donar de 2-5 ml de médula ósea o sangre que contenía blastos de AML para usarse en los ensayos de unión de anticuerpos. La médula ósea sana se donó por pacientes sometidos a toracotomía por cirugía cardíaca en nuestro instituto. Las células de linfoma no Hodgkin B se obtuvieron como material de residuo a partir de biopsias de pacientes con linfoma no Hodgkin B diagnosticado recientemente. Estas células de linfoma no Hodgkin B se usaron para probar la unión de nuestros anticuerpos como se describe más abajo. El material de residuo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECS), que se aislaron recientemente en el Departamento de Oftalmología (AMC, Ámsterdam, Países Bajos) se usó directamente para los ensayos de unión como se describe más abajo. Para la pureza, las células se tiñeron conjuntamente con y se seleccionaron para el CD14+ antihumano.

20
25
30 Las células mononucleares se aislaron a partir de la sangre periférica y la médula ósea de individuos sanos y pacientes con AML mediante la separación por Ficoll. Se usaron marcadores adicionales como CD45, CD33, CD34, CD14, CD3 y CD19 para aislar poblaciones de células específicas (blastos de AML, monocitos, linfocitos T y B, respectivamente, obtenidos de donantes de bancos de sangre).

35 Aislamiento de células B

Obtuvimos células B de sangre periférica mediante separación por Ficoll y microperlas MACS CD22 (Miltenyi Biotech). Subsecuentemente, clasificamos estas células para CD19+CD3-IgM-IgA- CD27- o CD27+ (células de IgG vírgenes o de memoria, respectivamente) y CD19+CD3-CD27+IgG-IgA- (células de IgM de memoria) en un FACSAria (Becton Dickinson).

40

Cultivo de células

45 Mantuvimos células B (2×10^5 células/ml) en medio de cultivo IMDM (Gibco) que contiene FBS al 8 % (HyClone) y penicilina/estreptomina (Roche), complementado con IL-21 de ratón recombinante (50 ng/ml, producida internamente) y se cultivaron conjuntamente en fibroblastos de células L de ratón γ -irradiados (50 Gy) que expresan establemente CD40L (células CD40L-L, 10^5 células/ml). Los cultivos se analizaron rutinariamente para detectar la presencia de micoplasma mediante PCR (datos no mostrados).

50 Transducción retroviral

55 La transducción retroviral se realizó como se describe en Kwakkenbos y otros, Nat Med 2010. Brevemente, se cultivaron células B vírgenes e IgG de memoria e IgM de memoria y se activaron durante 36 horas en células CD40L-L en presencia de mL-21. Después, los constructos retrovirales BCL6 y Bcl-xL que incluyen el gen marcador para GFP se usaron para transducir las células B como se describió anteriormente (Diehl y otros, J Immunol 2008), con la adición de que centrifugamos las células y el virus a temperatura ambiente durante 60 min a $360 \times g$ (1800 RPM). La eficiencia de transducción varió de 69-90 %.

60 Cultivo de líneas celulares objetivo

65 Las líneas celulares de AML objetivo THP-1 (ATCC; densidad de 2×10^5 células/ml a 1×10^6 células/ml) y Mono-Mac6 (un amable regalo del Dr. Hamann del Departamento de Inmunología Experimental, densidad de 2×10^5 células/ml a 2×10^6 células/ml) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), que contenía FBS al 10 % (HyClone) y penicilina/estreptomina (Roche). El medio de cultivo de Mono-Mac6 se enriqueció con aminoácidos no esenciales (Invitrogen), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen) e insulina humana 10 $\mu g/ml$ (Sigma). La línea celular de AML Molm13 se mantuvo a una densidad de 5×10^5 células/ml a $1,5 \times 10^6$ células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), que contenía

FBS al 20 % (HyClone) y penicilina/estreptomicina (Roche). Las líneas celulares de hígado HepG2 y Huh7 y la línea celular de colon HT29 (un amable regalo del Instituto Tytgat, AMC, Ámsterdam, Países Bajos) se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Gibco), que contenía FBS al 8 % (HyClone) y penicilina/estreptomicina (Roche). La línea celular de leucemia aguda de células T Jurkat (ATCC) se mantuvo en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), que contenía FBS al 10 % (HyClone) y penicilina/estreptomicina (Roche) a una densidad de 1×10^5 células/ml a 2×10^6 células/ml. Los fibroblastos primarios de piel (un amable regalo de la Universidad de Leiden, Países Bajos) se cultivaron dos veces por semana en medio de cultivo DMEM (Gibco), que contenía FBS al 10 % (HyClone) y penicilina/estreptomicina (Roche). Las células se pasaron no más de 10 veces. Las líneas celulares de linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés) OCI-Ly1 y OCI-Ly7 (DSMZ y ATCC, respectivamente) se mantuvieron en medio de cultivo IMDM (Gibco) que contenía FBS al 8 % (HyClone) y penicilina/estreptomicina (Roche). Los cultivos se mantuvieron a $0,5-2 \times 10^6$ células/ml. Finalmente, las líneas celulares de mieloma múltiple (MM) U266 y NCI-H929 se mantuvieron y cultivaron como se describió para las células THP-1.

15 Generación de clones específicos para la AML

Las células B vírgenes e IgG e IgM de memoria transducidas de cada paciente se sembraron a concentraciones de 20 o 40 células por pocillo (denominadas en lo sucesivo microcultivos) y se expandieron con IL-21 y CD40L. Después, los sobrenadantes de microcultivos de células B expandidas se analizaron para determinar la unión del anticuerpo a líneas celulares de leucemia (THP-1, MonoMac6 y las líneas celulares representadas en la Tabla 4), a líneas celulares de hígado y colon, y además algunos sobrenadantes a los blastos primarios aislados de pacientes con AML-M0, M1, M4 y M5, por FACS, mediante el uso de IgG-PE humana (Southern Biotech) o IgG H+L AF647 humana (Life Technologies) como un anticuerpo secundario. Se usaron varios anticuerpos generados internamente como anticuerpos de control negativo, tales como anti-CD30 (expresado en los linfocitos B y T activados), anti-CD33 (expresado en monocitos, células progenitoras mieloides y leucemias mieloides), D25 (contra RSV; se describe en el documento WO 2008/147196), AT10-002, AT10-004 (contra la influenza; se describe en el documento WO 2013/081463), y F1 (contra MRSA; se describe en el documento WO 2011/008092). Además, se usaron algunos anticuerpos disponibles comercialmente, tales como Rituximab (anti-CD20), Palivizumab (anti-RSV), Panitumumab (anti-EGFR) y HLA-DR. Se seleccionaron los microcultivos que se unieron a las líneas celulares de AML pero no a las líneas celulares de hígado y colon y se sembraron a una concentración de 1 célula/pocillo y sus sobrenadantes se probaron nuevamente para determinar la especificidad para las líneas celulares de AML. Se seleccionaron para la secuenciación los clones con sobrenadantes que se unen específicamente a líneas celulares de AML y no a líneas celulares de hígado o colon, o PBMC sanas y médula ósea. Los clones se expandieron en condiciones normales de cultivo en presencia de suero bajo en FBS IgG (Hyclone) y los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes de estos cultivos como se describe más abajo para los anticuerpos recombinantes.

35 Clonación de anticuerpos específicos para la AML

Para producir anticuerpos recombinantes, aislamos el ARN total con el mini kit RNeasy® (Qiagen), generamos ADNc, realizamos el PCR y clonamos las regiones variables de las cadenas pesada y ligera en el vector de clonación TA pCR2.1 (Invitrogen). Para descartar las mutaciones inducidas por transcriptasa inversa o ADN polimerasa, realizamos varios experimentos de clonación independientes. Para producir AcM recombinante, clonamos regiones variables pesadas y ligeras de cada anticuerpo en marco con IgG1 o IgG3 humanas y regiones constantes de Kappa en un vector basado en pcDNA3.1 (Invitrogen) y células 293T transfectadas transitoriamente. Purificamos los anticuerpos recombinantes del sobrenadante de cultivo con proteína A o G, en dependencia del subtipo Ig del clon.

45 Actividad *in vitro* de los anticuerpos específicos para la AML

Para medir el efecto *in vitro* de los anticuerpos específicos para la AML sobre las células de AML usamos varios enfoques. En primer lugar, las células THP-1 (2×10^4) se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar). Los anticuerpos para la AML o control se añadieron el día 1, en una concentración de 5-10 $\mu\text{g/ml}$. El número de células por pocillo se contó diariamente. La inducción de la muerte celular tanto en las células THP-1 como en las células leucémicas primarias por los anticuerpos específicos para la AML se midió en paralelo mediante tinción conjunta de una alícuota de células para la Anexina V (BD Pharmingen) y 7-Aminoactinomicina D (7-AAD; Beckman Coulter), las células doble negativas son las células viables. Además, usamos un ensayo de lisis específico. Las células objetivo (THP-1) se marcaron con calceína AM (Becton Dickinson), un colorante verde fluorescente que se libera del citoplasma cuando las células mueren. En resumen, se incubaron 2 millones de células THP-1 con 2 ml de calceína AM 2 μM durante 30 minutos a 37 °C. Se añadieron anticuerpos para la AML o control durante 4 horas, después de lo cual se midió la fluorescencia verde mediante el uso de un lector de placa de fluorescencia. La proporción de lisis específica se calculó como (valor experimental-control bajo)/(control alto-control bajo) x 100, donde control bajo significa la liberación espontánea de calceína AM por células no afectadas y control alto significa la cantidad máxima de calceína AM liberada cuando se lisan todas las células. Además del ensayo de liberación de calceína AM, aplicamos el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) para medir la actividad destructora de los anticuerpos específicos para la AML. La LDH se libera a partir del citosol por las células dañadas. Los blastos leucémicos, aislados en el momento del diagnóstico de un paciente con AML-M0, se incubaron con AT13-024 a una concentración máxima de 10 $\mu\text{g/ml}$ por 10.000 blastos. La liberación de LDH se mide después de añadir la mezcla de reacción y la solución de parada (Roche Diagnostics/Applied Science) de acuerdo con el protocolo del fabricante en un lector ELISA. El porcentaje de citotoxicidad se calcula como (valor experimental-control bajo)/(control alto-control bajo) x 100, donde control bajo significa la liberación espontánea de LDH por células no afectadas y control

5 alto significa la cantidad máxima de LDH cuando se lisan todas las células. Para cuantificar la muerte de las células objetivo inducida por anticuerpos específicos para la AML, usamos un ensayo de lisis de células de leucemia basado en FACS como se describió previamente (Schmiedel y otros, 2013). En resumen, se añadieron perlas de calibración de FACS (perlas fluorescentes Accudrop, BD Biosciences) a las células en una relación 50/50, después de lo cual se adquirió una cantidad estándar de perlas con FACS. Como las perlas de calibración determinaron un volumen de ensayo igual, la cantidad de células muertas o desaparecidas puede calcularse de la siguiente manera: $100 - ((\text{células negativas a Dapi en el tratamiento respectivo} / \text{células negativas a Dapi en el control}) \times 100)$.

10 Finalmente, para discernir entre las vías apoptóticas y no apoptóticas de la muerte celular inducida por nuestros anticuerpos, teñimos de forma conjunta las células objetivo con DiOC6 y yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés). El DiOC6 (yoduro de 3,3-dihexiloxacarbocianina) es un colorante lipófilo verde-fluorescente permeable a las células, que es selectivo para las mitocondrias de las células vivas, cuando se usa en concentraciones bajas. Las células apoptóticas perderán su potencial de membrana mitocondrial (pérdida de la tinción con DiOC6) antes de que la membrana celular se vuelva permeable (positiva para PI); las células necróticas se vuelven positivas para PI antes de perder su potencial de membrana mitocondrial (y se vuelven negativas para DiOC6). Los métodos usados para la tinción se adaptaron de Hugh J. M y otros, 2004. En resumen, las células THP-1 se tiñeron con 40 nM de DiOC6 (Invitrogen) durante 20 minutos a 37 °C. Se añadió PI, después de lo cual las muestras se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo.

20 Citometría de flujo

Las células teñidas se analizaron en citómetros de flujo FACSAria (BD), FACSCanto (BD), FACS LSRFortessa X-20 (BD) y Guava (Millipore) y los datos de citometría de flujo se procesaron con el programa informático FlowJo (Tree Star).

25 Obtención de imágenes por contraste de fase

Se añadieron células THP-1 a un sistema de cubreobjeto de vidrio con dos cámaras (LabTek). Mediante el uso de un microscopio de obtención de imágenes por contraste de fase (fabricado internamente), se eligieron cuatro campos de interés por cámara. El programa informático se configuró para tomar una fotografía de cada campo de interés cada dos minutos. Justo antes de la corrida, el anticuerpo no citotóxico AT13-023, unido a THP-1, y el anticuerpo citotóxico AT13-037, unido a THP-1, se añadieron a sus respectivos pocillos a una concentración de 10 µg/ml.

30 Verificación del objetivo: Inmunoprecipitación y citometría de flujo

35 Las células THP-1 se lisaron y se purificaron previamente con un anticuerpo irrelevante (anticuerpo D25 de RSV generado internamente) y perlas para eliminar las proteínas de unión no específicas. El lisado purificado previamente se incubó después con anticuerpos específicos para la AML marcados con perlas o con el anticuerpo específico para la influenza AT10-002 como control negativo (3 horas a 4 °C). Los lisados incubados con anticuerpos se lavaron cinco veces, las proteínas unidas se eluyeron del lisado de THP-1 y después se corrieron en un gel SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron y se tiñeron con Ponceau S para revelar la proteína total. La transferencia se bloqueó con BSA y se incubó con anti-snRNP200 de ratón (Millipore, clon 3B6.1) o anti-HMGB1 de conejo (Abcam) para el análisis de transferencia de Western. La tinción intracelular para el snRNP200 se realizó después de la fijación y la permeabilización de las células THP-1 con metanol (Sigma) y un tampón de permeabilización que contiene Triton X-100 (Sigma), EDTA (Gibco) y BSA (Roche), seguido de la incubación con anti-snRNP200 humano de conejo (Sigma) durante toda la noche a 4 °C.

45 Conformación del objetivo: ELISA de snRNP200

Las células HEK 293T se transfectaron con un vector de expresión que contiene el marco abierto de lectura de longitud completa del snRNP200 con una etiqueta FLAG N-terminal. A los 2 días después de la transfección, las células se cosecharon y se lisaron en un tampón de lisis que contenía inhibidores de proteasa. Este lisado se purificó y se midió la concentración de proteína. Después, los anticuerpos específicos para AML AT12-019, AT12-023, AT13-031 y AT13-037 o los anticuerpos específicos para el snRNP200 disponibles comercialmente (Bethyl Labs) se recubrieron en una placa ELISA. El lisado se añadió a una concentración de 3 µg/ml para la captura. Después de un lavado prolongado, el snRNP200-flag capturado se detectó con un anticuerpo monoclonal HRP anti-flag de ratón (Sigma-Aldrich, clon M2).

55 Resultados

Generación de anticuerpos específicos para la AML

60 En nuestro proyecto usamos una tecnología única que se desarrolló recientemente en nuestro laboratorio (documento WO 2007/067046; incorporado en la presente descripción como referencia) que permite la selección de las células B específicas para la leucemia de origen natural y los anticuerpos producidos por estas células. Empleamos esta tecnología para generar líneas de células B específicas para la leucemia a partir de dos pacientes con AML que desarrollaron respuestas potentes de GvL en paralelo con GvHD grave del hígado y la piel. Con nuestra técnica de inmortalización de células B, se hizo posible identificar las respuestas de células B de pacientes con leucemia y crear líneas de células B específicas de leucemia que permiten estudios funcionales de los anticuerpos que estas líneas celulares producen y

permiten la generación de un mayor número de anticuerpos, en comparación con otros métodos conocidos en la técnica, con potencial diagnóstico y terapéutico.

5 Primero, aplicamos nuestra técnica como se describe en el documento WO 2007/067046 para realizar una serie de experimentos piloto, donde aislamos e immortalizamos linfocitos B a partir de un paciente seleccionado cuidadosamente (donante 59) que desarrolló una respuesta GvL potente después de una extensa GvHD de hígado y piel. Este paciente se diagnosticó con AML a la edad de 36 años. Obtuvo una remisión completa después del primero de dos ciclos de quimioterapia de inducción, después de lo cual recibió un SCT de donante hermano HLA-compatible mieloablativo como terapia de consolidación. Solo 5 meses después del SCT, poco después de que se redujo la terapia inmunosupresora, su AML recayó. Con un ciclo de dosis alta de citarabina obtuvo nuevamente una remisión completa, después de lo cual, espontáneamente, antes de la infusión de linfocitos del donante programada, desarrolló GvHD en estadio III del hígado y GvHD en estadio II de la piel. Se trató con éxito con terapia de dosis alta de corticosteroides, pero durante la reducción de la terapia, la GvHD hepática recayó dos veces. Al final, la terapia con corticosteroides se discontinuó por etapas exitosamente aproximadamente 6 meses antes de que comenzaran los experimentos actuales (1,5 años después de la recaída de la AML) y ha permanecido en remisión completa de su leucemia durante más de tres años (Figura 2).

A partir de este paciente, generamos clones de células B mediante el uso de nuestra técnica para inmortalizar células B. Brevemente, las PBMC se aislaron a partir de la sangre periférica mediante centrifugación por ficoll y los linfocitos B se clasificaron por FACS. Los linfocitos B aislados se cultivaron después con IL21 y CD40L y se transdujeron con BCL6 y BCL-xL, con una eficiencia de transducción de alrededor del 70 %. Mediante el uso de esta técnica, se generaron clones únicos de células B que simultáneamente expresan el receptor de células B y secretan anticuerpos monoclonales. Se sembraron células B IgG+ de memoria CD27+ y vírgenes CD27- inmortalizadas a concentraciones de 20 o 40 células por pocillo y se expandieron con IL21 y CD40L. Los sobrenadantes de los microcultivos de células B expandidas se seleccionaron entonces para determinar la unión de anticuerpo a las líneas celulares de leucemia, hígado y colon mediante FACS, mediante el uso de IgG-PE humana como un anticuerpo secundario de detección.

Como el paciente se había diagnosticado con AML-M5 de acuerdo con la clasificación franco-estadounidense-británica (FAB) (Bennett y otros, 1976), seleccionamos la línea celular THP-1 que morfológicamente y fenotípicamente es similar aproximadamente a la AML-M5 para estos ensayos de selección (Tsuchiya y otros, 1988). Además, debido a que el paciente padecía de GvHD extensa del hígado, tamizamos para identificar los clones de células B con unión al hígado mediante el uso de la línea celular hepática HepG2. Como control negativo, y para seleccionar los clones de células B de unión cruzada, usamos las líneas celulares de colon HT-29 y LSTR. Los microcultivos con la mayor unión a cualquiera de estas líneas celulares se clasificaron entonces y las células individuales se depositaron en formatos de 96 pocillos, se expandieron y los sobrenadantes de estos clones expandidos se seleccionaron nuevamente para determinar su unión contra líneas celulares de leucemia (Figura 3).

Propiedades de los anticuerpos específicos para la AML

Con este enfoque, generamos ocho líneas de células B a partir de este paciente, que producen anticuerpos que se unen a THP-1 (Figura 3) pero no a líneas celulares de hígado o colon, fibroblastos, células endoteliales (células endoteliales de vena umbilical humana o HUVEC), PBMC sanas o médula ósea (Tabla 2 y Figura 4). Estos son los anticuerpos AT12-019, AT12-023, AT12-025, AT13-022, AT13-023, AT13-024, AT13-031 y AT12-020. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de estos anticuerpos se representan en la Tabla 1 y la Figura 1.

45 Curiosamente, los anticuerpos son de los isotipos IgG1 e IgG3, y varias de las secuencias de ADN mostraron hipermutaciones somáticas. Los anticuerpos AT12-023, AT12-025, AT13-023 y AT13-031 pertenecen a la familia VH4-34, que es una familia de secuencias VH conocida por sus propiedades de destrucción potenciales (Bhat y otros, 1997). Los anticuerpos son de origen del donante, como lo confirman los análisis de microquimerismo.

50 Después, determinamos la amplitud de unión dentro del espectro de los subtipos de AML y probamos los clones de células B específicos para AML generados para determinar la unión a otros tipos de clasificación FAB de AML. Los clones específicos de leucemia seleccionados se unieron además a la línea celular de AML-M5 MonoMac6 (Tabla 3) (ver para una revisión de las líneas celulares de AML (Drexler y Minowada, 1998)).

55 Nuestros anticuerpos específicos para la AML se unen además a blastos de AML recién aislados de pacientes recién diagnosticados (Tabla 3 y Figura 5).

60 Además, algunos anticuerpos se unieron, además, a otras líneas celulares malignas hematopoyéticas, tales como las líneas celulares de linfoma difuso de células B grandes OCI-Ly1 y OCI-Ly7 y las líneas celulares de mieloma múltiple U266 y NCI-H929, y/o células tumorales hematológicas derivadas del paciente (tabla 4 y figura 6).

Actividad in vitro de anticuerpos específicos para la AML

65 Al probar la especificidad de los anticuerpos de unión a AML, hicimos una observación sorprendente. Tres de los ocho anticuerpos indujeron espontáneamente la muerte de las células leucémicas a las que se unieron. Las células THP-1 se

destruyeron con AT12-023 y AT12-025, y los blastos de AML primarios aislados a partir de pacientes diagnosticados con AML se destruyeron con AT12-025 y AT12-024 (Tabla 5 y Figuras 7-10).

La Figura 7 muestra la destrucción rápida de células THP-1 por el AT12-023. Los blastos moribundos expresaron 7-AAD y Anexina V. Sorprendentemente, mientras que el cocultivo de THP-1 con AT12-025 al principio no afectó el número total de células en los cultivos (Figura 7), este anticuerpo parece inducir también la muerte de células THP-1, aunque con un poco de retraso en comparación con el AT12-023 (Figura 8). La observación de que algunos de los anticuerpos muestran una actividad de destrucción directa contra las células leucémicas es altamente emocionante y, hasta donde tenemos conocimiento, no se ha informado anteriormente.

Confirmación de nuestros hallazgos mediante la generación de líneas de células B específicas para la AML a partir de un segundo paciente

Se encontró que aproximadamente del 0,05 al 0,1 % de las células B que examinamos a partir del primer paciente eran específicas para la AML. Para confirmar nuestros hallazgos, seleccionamos un segundo paciente con AML en recaída que obtuvo una remisión duradera después de un SCT alogénico (donante 58; Figura 11). Además, esta paciente desarrolló GvHD de la piel y el hígado, por lo que se trató con esteroides orales. Después de que se eliminaron por etapas los esteroides, aproximadamente un año después del SCT, se aislaron las PBMC, las células B se immortalizaron y las líneas de células B se examinaron para determinar su unión a las líneas celulares de AML como se describió anteriormente. Se han generado cinco clones de células B a partir de esta paciente que se unen a las líneas celulares de AML THP-1 y MonoMac6 (Figura 12), pero no a líneas celulares de hígado o intestino, fibroblastos o PBMC sanas (Tabla 6). Estos clones producen los anticuerpos AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT13-036 y AT13-037. Curiosamente, todos estos anticuerpos son del isotipo IgG3. Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de estos anticuerpos se representan también en la Tabla 1 y la Figura 1. Estos datos confirman la viabilidad de nuestro proyecto; a pesar de las frecuencias bajas de las células B a las que nos dirigimos, pudimos aislarlas y generar líneas de células B robustas productoras de anticuerpos que fueron específicos para la AML.

Discusión

Estos datos preliminares son muy emocionantes, ya que, hasta donde tenemos conocimiento, somos los primeros en generar varios clones de linfocitos B humanos, no quiméricos y específicos de leucemia a partir de pacientes que desarrollaron una respuesta GvL robusta y duradera contra la AML. La observación de que algunos de estos anticuerpos muestran espontáneamente una actividad destructora contra los blastos leucémicos *in vitro* es altamente emocionante y muy prometedora. Además, la observación de que algunos de los anticuerpos tienen una secuencia de línea germinal y son de la subclase IgG3, un tipo de anticuerpo que puede inducirse sin ayuda de células T, merece atención adicional ya que estos hallazgos demuestran que los anticuerpos "naturales" generados de una manera independiente de las células T afecta las respuestas GvL en pacientes con SCT. Es importante destacar que estos datos ofrecen una prueba de concepto de que, mediante el uso de esta técnica, podemos seleccionar los clones de células B específicos de leucemia.

Ejemplo 2

Anticuerpos específicos para la AML a partir de un tercer paciente

Para confirmar aún más nuestro enfoque y mostrar que esta respuesta contra la AML no solo se reserva a las mujeres, seleccionamos también un paciente masculino. Este paciente (Figura 13), donante 101, se diagnosticó con una AML de riesgo intermedio (sin anomalías citogenéticas o moleculares; clasificación FAB AML-M5) a la edad de 49 años. Recibió dos ciclos de quimioterapia (citarabina, idarubicina, amsacrina) y un ciclo de quimioterapia de consolidación (busulfán, ciclofosfamida) seguido de un HSCT autólogo, ya que no había un donante de células madre hermano HLA-compatible. Catorce meses después del primer diagnóstico recayó de su enfermedad. Obtuvo una remisión completa después de un ciclo de citarabina en dosis alta, después de lo cual recibió un HSCT alogénico de intensidad reducida de un donante compatible no relacionado (RIST-MUD). Seis semanas después, desarrolló una GvHD aguda de piel, hígado e intestino (estadio 1; grado II) que respondió bien a la terapia con corticosteroides. Las células B se aislaron de un producto de flebotomía obtenido a partir de este paciente 38 meses después del SCT.

Mediante el uso de los mismos métodos que se describen en el Ejemplo 1, se han generado cuatro clones de células B a partir de este paciente que se unen a las líneas celulares de AML THP-1 y/o Molm13 (Figura 14 y Tabla 7) pero no a líneas celulares de hígado o intestino (fetal), fibroblastos o PBMC sanas (Tabla 8). Estos clones producen los anticuerpos AT14-013 (IgG1), AT14-014 (IgG3), AT14-015 (IgG3) y AT14-016 (IgG3). Curiosamente, de nuevo la mayoría de los anticuerpos es del isotipo IgG3. Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de estos anticuerpos muestran cantidades altas de hipermutaciones somáticas y se representan en la Tabla 1B y la Figura 1. El clon AT14-013 muestra una reactividad muy baja con la línea celular de carcinoma hepatocelular Huh7, pero no con la línea celular de carcinoma hepatocelular HepG2 o células hepáticas fetales sanas. Además, se observa una reactividad baja hacia los fibroblastos, sin embargo, la unión de este anticuerpo a estas células específicas de tejido, en comparación con la unión a los blastos leucémicos primarios, es insignificante (Figura 14).

Además, se probó si los cuatro anticuerpos del donante 101 podían unirse a los blastos de AML primarios (Materiales y Métodos: ver Ejemplo 1). La Figura 15 y la Tabla 7 muestran que el anticuerpo AT14-013 parece unirse a blastos primarios de al menos tres clasificaciones FAB diferentes (AML-M0, M4 y M5). Los anticuerpos AT14-015 y AT14-016 pueden unirse a blastos de AML primarios de la clasificación M4.

5

Ejemplo 3

Actividad in vitro de anticuerpos específicos para la AML de los donantes 59, 58 y 101

10 En el Ejemplo 1, se determinó la amplitud de unión de los anticuerpos del donante 59 dentro del espectro de los subtipos de AML (Tabla 3). Mediante el uso de los mismos métodos, esto también se ha determinado para los anticuerpos del donante 58. Los resultados se muestran en la Tabla 9A: los cinco anticuerpos del donante 58 (AT13-033, AT13-034, AT13-035, AT 13-036 y AT 13-037) se unieron a la línea celular de AML-M5 THP-1, así como también a la línea celular de AML-M5 MonoMac6. Estos anticuerpos específicos para la AML no se unieron significativamente a blastos de AML recién aislados de pacientes recién diagnosticados de clasificación FAB M0, M1 o M4. El AT13-034 solo pudo unirse débilmente a los blastos M0. Esto indica que estos anticuerpos tienen una especificidad por (al menos) los blastos de AML M5.

15

20 En el Ejemplo 1, se determinó además que los anticuerpos AT12-023 y AT12-025 del donante 59 destruyeron las células THP-1 (Tabla 5 y Figuras 7-9). Subsecuentemente, hemos probado si los otros anticuerpos del donante 59, así como también los anticuerpos del donante 58, también podrían destruir las células THP-1, mediante el uso de los mismos Materiales y Métodos que en el Ejemplo 1. Como se muestra en las Tablas 9B-10, además de AT12-023 y AT12-025, también el anticuerpo AT13-031 (donante 59), así como también los anticuerpos AT13-033, AT13-035, AT13-036 y AT13-037 (donante 58) parecen ser capaces de destruir las células THP-1.

20

25 Además, se probó la capacidad de inducir la muerte de blastos de AML primarios (Materiales y Métodos: ver Ejemplo 1). De manera similar a algunos de los anticuerpos obtenidos a partir del donante 59, algunos de los anticuerpos derivados a partir del donante 58 también son capaces de inducir la muerte celular de células de AML primarias. Esto se muestra en la Figura 16 para el anticuerpo AT13-037, en ambas formas (sobrenadante de células B purificadas (sAT13-037) y anticuerpo producido recombinantemente (rAT13-037); ambos en la confirmación de IgG3). Las células leucémicas se derivan a partir de la médula ósea de un paciente con AML recién diagnosticada, clasificación FAB AML-M5.

30

Ejemplo 4

La actividad in vitro de los anticuerpos para la AML es rápida e implica una vía de muerte celular no apoptótica

35

Para investigar la vía a través de la cual varios de los anticuerpos mencionados anteriormente indujeron la muerte de sus células objetivo, visualizamos la muerte de las células objetivo con microscopía de lapso de tiempo (Figura 17a). Observamos que, pocos minutos después de la incubación con el anticuerpo AT13-037, las células empezaron a hincharse y luego murieron. Esto sugirió que los anticuerpos de acuerdo con la invención activaban vías distintas a las vías de apoptosis clásicas, ya que las células apoptóticas se encogen en lugar de hincharse. Para investigar más a fondo esto, realizamos una doble tinción con los marcadores de muerte celular DiOC6 y yoduro de propidio (PI). Las células comprometidas a experimentar apoptosis primero pierden la carga mitocondrial (lo que puede visualizarse mediante la pérdida de la unión a DiOC6) antes de que aumente la permeabilidad de la membrana (visualizada mediante tinción con yoduro de propidio (PI)), mientras que las células que experimentan necrosis pierden su integridad de membrana (positivas para PI) pero no inmediatamente el potencial de membrana mitocondrial. Como se conoce que el diclofenaco induce la apoptosis de las células THP-1, usamos el diclofenaco como control positivo. Las células THP-1 apoptóticas tratadas con diclofenaco se convirtieron en negativas para DiOC6 (pérdida de potencial de membrana mitocondrial), pero mantuvieron la integridad de la membrana. Tras la incubación con el anticuerpo citotóxico específico para la AML AT12-023, se mantuvo el potencial de membrana mitocondrial (positivas para DiOC6) mientras que la permeabilidad de membrana de las células THP-1 aumentó (positivas para PI). Por lo tanto, las células THP-1 tratadas con anticuerpos para la AML se volvieron positivas para PI a la vez que mantenían el potencial de membrana mitocondrial (Figura 17b, panel derecho) lo que indica la activación de una vía de muerte no apoptótica. De hecho, la muerte de las células THP-1 por el tratamiento con anticuerpo citotóxico específico para la AML no pudo prevenirse mediante la incubación de las células con los inhibidores de las caspasas Z-VAD-fmk o QVD-OPh (Figura 17c).

40

45

50

55

Muerte celular mediada por interferencia con la membrana de la célula objetivo

Las vías de muerte no apoptóticas incluyen necroptosis y oncosis. La necroptosis es, similar a la apoptosis, una vía de muerte celular activa que depende de la activación de vías moleculares definidas, lo que incluye la activación de la proteína quinasa 3 de interacción con el receptor (RIPK3, por sus siglas en inglés). Para investigar si la muerte celular inducida por anticuerpos para la AML dependía de la activación de las vías moleculares intracelulares, probamos si la citotoxicidad inducida por el anticuerpo dependía de la temperatura. Encontramos que en estas condiciones experimentales, las actividades citotóxicas de al menos los anticuerpos AT13-033, AT13-035, AT13-036, AT13-037, AT12-023 y AT12-025 eran igualmente potentes a 4 °C en comparación con sus actividades a 37 °C (Figura 18), lo que sugiere que al menos estos anticuerpos indujeron la muerte celular mediante un proceso pasivo. Es de destacar que la actividad citotóxica del anticuerpo AT13-031 fue más potente significativamente a 37 °C en comparación con a 4 °C. Sin embargo, dado que el

60

65

anticuerpo AT13-031 induce la muerte de células de AML en presencia de inhibidores de la apoptosis (tales como los inhibidores de las caspasas Q-VD-OPh o Z-VAD-fmk), está claro que el anticuerpo AT13-031 también es capaz de disminuir la proliferación de células de AML independientemente de la apoptosis.

5 La oncosis es un modo de muerte celular que se caracteriza por la hinchazón de la célula, mediante una lesión selectiva de la membrana, lo que resulta en un aumento de la permeabilidad de la membrana y, en última instancia, en la muerte celular. Se han descrito anticuerpos que inducen oncosis que median la muerte celular al formar poros grandes en la membrana mediante la desestabilización de la membrana (Hernandez y otros, 2011). La citocalasina D es un inhibidor de la polimerización de la actina que puede estabilizar el citoesqueleto. El tratamiento de la línea celular objetivo THP-1 con
10 citocalasina D no impidió la unión del anticuerpo a estas células (Figura 19a), sin embargo, sí impidió la muerte de las células objetivo (Figura 19b). Por lo tanto, la estabilización de la membrana protege a las células objetivo contra la actividad citotóxica de nuestros anticuerpos.

Ejemplo 5

15 Uno de los objetivos reconocidos por nuestros anticuerpos es el snRNP200

Después, nos propusimos determinar el objetivo reconocido por varios anticuerpos específicos para la AML. Para esto usamos la inmunoprecipitación de lisados de la membrana celular de las células THP-1 con AT12-023 y AT13-031.
20 Encontramos una banda de proteína evidente a 250 kD que se envió para el análisis de espectrometría de masas, el cual reveló al snRNP200 como el antígeno objetivo lo cual puede confirmarse mediante el análisis de transferencia de Western (Figura 20a). Desarrollamos un ELISA para verificar al snRNP200 como el objetivo de algunos de los anticuerpos para la AML. Con este ELISA, encontramos que además de AT12-023 y AT13-031, el AT13-037 reconoce específicamente el snRNP200 (Figura 20b). Otros anticuerpos específicos para la AML, como el AT12-019, no reconocieron al snRNP200
25 como antígeno objetivo.

El snRNP200 es parte del espliceosoma en todas las células eucarióticas y, por lo tanto, se espera que se localice en el núcleo. Para confirmar que las células de AML expresan esta proteína sobre su superficie celular, teñimos la membrana celular de las células THP-1 con un anticuerpo anti-snRNP200 disponible comercialmente. La Figura 21 muestra que el anticuerpo anti-snRNP200 se une en efecto a la membrana de las células AML, pero no a la línea celular Jurkat. Como se esperaba, como el snRNP200 es una proteína nuclear, se unió intracelularmente a las líneas celulares Jurkat y THP-1 (Figura 21).
30

Todas las células eucariotas tienen la proteína snRNP200 (conocida también como U5-snRNP) en el núcleo, como parte del espliceosoma (Kattah, 2010). El espliceosoma consiste en una serie de proteínas. Se ha descrito que al menos una de estas proteínas, U1-snRNP, se expresa en células apoptóticas en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE, por sus siglas en inglés) y enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD) lo que conduce a respuestas autoinmunitarias (Kattah, 2010).
35

Proponemos que la expresión del snRNP200 por las células de AML ha desencadenado una respuesta aloinmunitaria (respuesta de injerto contra leucemia) que ha mantenido a los pacientes en remisión duradera. Por lo tanto, esta proteína ahora puede usarse como un nuevo objetivo de la AML. Además, dado que los anticuerpos AT12-023 y AT13-031 reconocen específicamente el snRNP200 y también reconocen las células B-NHL, ahora también puede usarse el snRNP200 como un objetivo para el B-NHL.
40
45

Tabla 1A. Anticuerpos contra la AML preferidos de acuerdo con la invención (numeración CDR de acuerdo con Kabat y otros 1991)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
1	AT12-023	CDR1 de cadena pesada	GYYS
2	AT12-025	CDR1 de cadena pesada	GYYS
3	AT13-024	CDR1 de cadena pesada	SYGMH
4	AT12-019	CDR1 de cadena pesada	SYAMS
5	AT13-022	CDR1 de cadena pesada	SYGMH
6	AT13-023	CDR1 de cadena pesada	GYFWT
7	AT13-031	CDR1 de cadena pesada	GYYS
8	AT12-020	CDR1 de cadena pesada	TYSMN
9	AT13-033	CDR1 de cadena pesada	NYGMH
10	AT13-034	CDR1 de cadena pesada	SHAIH
11	AT13-035	CDR1 de cadena pesada	SYGMH
12	AT13-036	CDR1 de cadena pesada	SYSMN
13	AT13-037	CDR1 de cadena pesada	TYGMH
14	AT12-023	CDR2 de cadena pesada	EINHSNSTNYNPSLKS
15	AT12-025	CDR2 de cadena pesada	EINHSNSTNYNPSLKS
16	AT13-024	CDR2 de cadena pesada	FIRYDGSNKYFADSVRG
17	AT12-019	CDR2 de cadena pesada	TIRASGGSTSYADSVKVG
18	AT13-022	CDR2 de cadena pesada	ISYDGSNKYYADSVKVG
19	AT13-023	CDR2 de cadena pesada	ETVHSGGTNYNPSLKS
20	AT13-031	CDR2 de cadena pesada	EINHSNSTNYNPSLKS
21	AT12-020	CDR2 de cadena pesada	SISSSSGYIYYADSVKVG
22	AT13-033	CDR2 de cadena pesada	VISHDGSKTTYGHSVKVG
23	AT13-034	CDR2 de cadena pesada	LWYDGSNNYYADSVKVG
24	AT13-035	CDR2 de cadena pesada	VISYDGSNKYYADSVKVG
25	AT13-036	CDR2 de cadena pesada	SISSSSTIYYADSVKVG

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
26	AT13-037	CDR2 de cadena pesada	VIVYDGSNTYYADSVKKG
27	AT12-023	CDR3 de cadena pesada	GRSTSPLDYYYYYMDV
28	AT12-025	CDR3 de cadena pesada	GSMARPKPFDY
29	AT13-024	CDR3 de cadena pesada	DPQERIYYSDTSGYLDY
30	AT12-019	CDR3 de cadena pesada	SPAMIRGVRGGDYFDY
31	AT13-022	CDR3 de cadena pesada	DGKGIWYYYYYGMVDV
32	AT13-023	CDR3 de cadena pesada	GLNSPFDY
33	AT13-031	CDR3 de cadena pesada	GPRGMYSSSSSGDY
34	AT12-020	CDR3 de cadena pesada	DGTFYYYYYMDV
35	AT13-033	CDR3 de cadena pesada	AGLNYGNULLSNFYFYGMVDV
36	AT13-034	CDR3 de cadena pesada	ARDGCTGGSCCYFDN
37	AT13-035	CDR3 de cadena pesada	AKDSYFYSGRRRWGYFDY
38	AT13-036	CDR3 de cadena pesada	ARRREVGRDGYSLYPRGYHYGMVDV
39	AT13-037	CDR3 de cadena pesada	ARRGYSAQGNRNRAYFDY
40	AT12-023	CDR1 de cadena ligera	QGDFLRSYYAS
41	AT12-025	CDR1 de cadena ligera	RASQISIRYLN
42	AT13-024	CDR1 de cadena ligera	RASQSISSWLA
43	AT12-019	CDR1 de cadena ligera	RASQAFSSYLV
44	AT13-022	CDR1 de cadena ligera	SGDKLGDKYAC
45	AT13-023	CDR1 de cadena ligera	RASQGIRNVLG
46	AT13-031	CDR1 de cadena ligera	RASQGIRNDLG
47	AT12-020	CDR1 de cadena ligera	RASQDISSSLA
48	AT13-033	CDR1 de cadena ligera	TGTSSDIgYNYYS
49	AT13-034	CDR1 de cadena ligera	RASQSISSNVLG
50	AT13-035	CDR1 de cadena ligera	QGDSLRSYYAS

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
51	AT13-036	CDR1 de cadena ligera	TGTSDDVGGYNYVS
52	AT13-037	CDR1 de cadena ligera	RASQSVSSNLA
53	AT12-023	CDR2 de cadena ligera	GKMKRPS
54	AT12-025	CDR2 de cadena ligera	AASSLQS
55	AT13-024	CDR2 de cadena ligera	KASSLES
56	AT12-019	CDR2 de cadena ligera	ATSTLQG
57	AT13-022	CDR2 de cadena ligera	QDSKRPS
58	AT13-023	CDR2 de cadena ligera	AASSLQS
59	AT13-031	CDR2 de cadena ligera	AAVSLQS
60	AT12-020	CDR2 de cadena ligera	AASTLQS
61	AT13-033	CDR2 de cadena ligera	EVTKRPS
62	AT13-034	CDR2 de cadena ligera	GASTRAT
63	AT13-035	CDR2 de cadena ligera	GKNNRPS
64	AT13-036	CDR2 de cadena ligera	DVNDRPS
65	AT13-037	CDR2 de cadena ligera	GAFTRVT
66	AT12-023	CDR3 de cadena ligera	NSRDRSGNHLV
67	AT12-025	CDR3 de cadena ligera	QQSYSTPRT
68	AT13-024	CDR3 de cadena ligera	QQYNTYPYT
69	AT12-019	CDR3 de cadena ligera	QQYYSYPPT
70	AT13-022	CDR3 de cadena ligera	QAWDSSTVWF
71	AT13-023	CDR3 de cadena ligera	LQHNSHPRT
72	AT13-031	CDR3 de cadena ligera	LQHNSYPRT
73	AT12-020	CDR3 de cadena ligera	QQYYSYPPT
74	AT13-033	CDR3 de cadena ligera	SSYAGSNDLL
75	AT13-034	CDR3 de cadena ligera	QQYNNWPRLT

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
76	AT13-035	CDR3 de cadena ligera	NSRDSGGNHVV
77	AT13-036	CDR3 de cadena ligera	SSYTRSNTVI
78	AT13-037	CDR3 de cadena ligera	QYNDRPPPYT
79	AT12-023	Cadena pesada	QVQLQQWGAQLLKPESETLSTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPGKGLWGEINHSNSTNPSLKSRTISV DTSKNTFLQMSLRAEDTAVYYCARGRSTSPLDYVYMDVWAKGTTVTSS
80	AT12-025	Cadena pesada	QVQLQQWGAQLLKPESETLSTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPGKGLWGEINHSNSTNPSLKSRTISV DTSKNTFLQMSLRAEDTAVYYCARGSMARPKPFDYWGQGLTAVSS
81	AT13-024	Cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLWVAFRIYDGSNKYFADSVRGRFTIS RDSKNTFLQMSLRAEDTAVYYCAKDPQERYYSDTSGLDYWGQGLTAVSS
82	AT12-019	Cadena pesada	EVHLLSEGGGIVQFGGSLRSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLWVSTIRASGGSTSYADSVKGRFTISR DNSQSRLYLQMSLRAEDTAVYYCAKSPAMIRGVRRGGDYDWGQGLTAVSS
83	AT13-022	Cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTIS RDSKNTYLQMSLRAEDTAVYYCAKDGKIVVYYGMDVWVGQGLTAVSS
84	AT13-023	Cadena pesada	QVQLQQWGAQLLKPESETLSTCAVYGGFSFGYFTWIRQPGKGLWGEINHSNSTNPSLKSRTISV DTSKNTFLQMSLRAEDTAVYYCVRGLNSPFDYWGQGLTAVSS
85	AT13-031	Cadena pesada	QVQLQQWGAQLLKPESETLSTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPGKGLWGEINHSNSTNPSLKSRTISV DTSKNTFLQMSLRAEDTAVYYCARGPRMYSSSDYWGQGLTAVSS
86	AT12-020	Cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSCAASGFTFTSYSMNWVRQAPGKGLWVSSSSGYYIYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCARDGTFSSYYMDVWVGKTTVTSS
87	AT13-033	Cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGSLFRNYGMHWVRQAPGKGLWVAVISHDGSRTYYGHSVKGRFTI SRDSKNTMLFLQMSLRAEDTAVYYCAKAGLNYYGNLLSNFYFGMDVWVGQGLTAVSS
88	AT13-034	Cadena pesada	QVHLLVESGGGVVQPGTSLRSCAASEFTFSSHAHWVRQAPGKGLWVAVIWDGNSNNYADSVKGRFTIS RDSKNTVHLQMSLRAEDTAVYYCARDGCTGGSCCYFDNWGQGLTAVSS
89	AT13-035	Cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTIS RDSKNTYLQMSLRAEDTAVYYCAKDSYYGSGRRWGYFDYWGQGLTAVSS
90	AT13-036	Cadena pesada	EVQLVESGGGLVQFGGSLRSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLWVSSSSSTYYIYADSVKGRFTISR DNARNSLYLQMSLRAEDTAVYYCARRREVGRDGYSLYPRGYHGMVWVGQGLTAVSS

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
91	AT13-037	Cadena pesada	QVQLVESGQGVVQPGRLSRLLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLWEVAWVYDGSNTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQIKSLRAEDTAVYYCARGRYSAGQRNRRAYYPDYWGQGLTVVSS
92	AT12-023	Cadena ligera	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCCQDFLRSYYASWYQKPKGQAPVLFVFGKRNKRPSPGIPDRFSGSSSGNTASL TITGAQAEDEADYYCNSRDRSGNHLVFGGQTKLTVL
93	AT12-025	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQISIRYLAWYQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFTL TISSLQPEDEAFATYYCQSYSTPRTFGTKVDIK
94	AT13-024	Cadena ligera	DIQMTQSPSTLSASVGDRTTTCRASQSSISWLAWYQKPKAPKLLIYKASSLESQVPSRFSGSGGTEFTL TISSLQPEDEAFATYYCQYNTYPTFGQTKLEIK
95	AT12-019	Cadena ligera	AIRLTQSPSSVASTGDRVTITCRASQAFSSYLAWYQKPKAPNLLIYATSTLQGGVPSRFSGSGGTDFTL TISNLQSEDEAFATYYCQYYPPTFGQTKLEIK
96	AT13-022	Cadena ligera	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQKPKGQSPVLIYQDSKRPSPGIPERFSGSNSGNTATL TISGTAQAMDEADYYCQAWDSSIVVFGGQTKLTVL
97	AT13-023	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGIRNVLGWYQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTEFTL TISSLQPEDEAFATYYCLQHINSHPRTFGQTKVEIK
98	AT13-031	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGIRNDLWYQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTEFT LTSSSLQPEDEAFATYYCLQHINSYPRTFGQTKLEIK
99	AT12-020	Cadena ligera	AIRMTQSPSSASTGDRVTITCRASQDISSLAWYQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFTL TISCLQSEDEAFATYYCQYYPPTFGQTKLEIK
100	AT13-033	Cadena ligera	QSALITQPPSASGSPGQSYTISCTGTSDDIGYNYYSWYQHHPGKAPKLLIYEVTKRPSGVDRFSGSKSGNT ASLTVSGLQAEDEAHYCYSSYAGSNDLLFGGQTKLTVL
101	AT13-034	Cadena ligera	EYVMTQSPATLTVSIFGERATLSCRASQSSINNLGWYQKPKGQAPRLIYGASTRATGIPRFSGSGGTEFT LTYSLQSEDEAFATYYCQYNNWRPLTFGGQTKVEIK
102	AT13-035	Cadena ligera	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCCQDLSLSYYASWYQKPKGQAPVLIYKRNRPSPGIPDRFSGSSSGNTASL TITGAQAEDEADYYCNSRDRSSGNHLVFGGQTKLTVL

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
103	AT13-036	Cadena ligera	QSALTPASVSGSPRQSIITISCTGTSSDVGGYNYSWYQQLPKAKPLMIYDVNDRPFGVSIKPSGSKSGNT ASLTISGLQAEDEADYYCSSYTRSNVTFGGGKLTVL
104	AT13-037	Cadena ligera	EIVMTQSPATLSVSPGERVILSCRASQSYSSNLAWYQKPKPGQPPRLLIYGAFTRVTGVPARFSGSGSCTEFTL TSSLSQSEDFAVYQCQYNDRPPYTFGGCTKLEIK
105	AT12-023	CDR1 de cadena pesada	ggt tac tac tgg agc
106	AT12-025	CDR1 de cadena pesada	ggt tat tac tgg agc
107	AT13-024	CDR1 de cadena pesada	agc tat ggc atg cac
108	AT12-019	CDR1 de cadena pesada	agc tat gcc atg agt
109	AT13-022	CDR1 de cadena pesada	agc tat ggc atg cac
110	AT13-023	CDR1 de cadena pesada	ggt tac ttc tgg acc
111	AT13-031	CDR1 de cadena pesada	ggt tac tac tgg agc
112	AT12-020	CDR1 de cadena pesada	acc tat agc atg aac
113	AT13-033	CDR1 de cadena pesada	aat tat ggc atg cac
114	AT13-034	CDR1 de cadena pesada	tcc cat gcc ata cac
115	AT13-035	CDR1 de cadena pesada	agc tat ggc atg cac
116	AT13-036	CDR1 de cadena pesada	agt tat agc atg aac
117	AT13-037	CDR1 de cadena pesada	acc tat ggc atg cac
118	AT12-023	CDR2 de cadena pesada	gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac cgc tcc ctc aag agt
119	AT12-025	CDR2 de cadena pesada	gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac cgc tcc ctc aag agt
120	AT13-024	CDR2 de cadena pesada	ttt ata cgg tat gat gga agt aat aaa tac ttt gca gac tcc gtg agg ggc
121	AT12-019	CDR2 de cadena pesada	actuar de acuerdo con los ggt ggt agc aca agc tac gca gc tcc gtg aag ggc
122	AT13-022	CDR2 de cadena pesada	ata tca tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gc tcc gtg aag ggc
123	AT13-023	CDR2 de cadena pesada	gaa acc gtt cat agt gga ggc acc aac tac aac cgc tcc ctc aag agt
124	AT13-031	CDR2 de cadena pesada	gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac cgc tcc ctc aag agt
125	AT12-020	CDR2 de cadena pesada	tcc att agt agt agt ggt tac ata tac tac gca gac tca gtg aag ggc

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
126	AT13-033	CDR2 de cadena pesada	gtc att tcg cat gat gga agt aag aca tac tat gga cac tcc glg aag ggc
127	AT13-034	CDR2 de cadena pesada	ctt ala tgg tat gat gga agt aat aat tat gca gac tcc glg aag ggc
128	AT13-035	CDR2 de cadena pesada	gtt ala tca tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gc tcc glg aag ggc
129	AT13-036	CDR2 de cadena pesada	tcc att agt agt agt agt act tac tac tac gca gac tca gfg aag ggc
130	AT13-037	CDR2 de cadena pesada	gtt ala tgg tat gat gga agt aat aca tac tat gca gc tcc glg aag ggc
131	AT12-023	CDR3 de cadena pesada	ggc cgt agt acc agc ccg ctc gac tac tac tac tac alg gac gtc
132	AT12-025	CDR3 de cadena pesada	ggc tca atg gca aga ccc aag cca ttt gac tac
133	AT13-024	CDR3 de cadena pesada	gcg aaa gat ccc caa gag cgt att tat tac tct gat act to ggt tac ctt gac tac
134	AT12-019	CDR3 de cadena pesada	tct cct gct atg att cgg gga gtt agg ggg ggt gac tac ttt gac tac
135	AT13-022	CDR3 de cadena pesada	gat ggg aag ggg att gta gtt att tac tac tac tac ggt atg gac gtc
136	AT13-023	CDR3 de cadena pesada	ggc ctt aac agc ccc tt gac tac
137	AT13-031	CDR3 de cadena pesada	ccc cgg ggc atg tat agc tgc tcc ggg gac tac
138	AT12-020	CDR3 de cadena pesada	gat ggg act ttc tcc tac tac tac tac atg gac gtc
139	AT13-033	CDR3 de cadena pesada	gcc ggg ttg aac tac tat gga aac cta tta tca aac tac ttc tac gga atg gac gtc
140	AT13-034	CDR3 de cadena pesada	gcg aga gat ggt tgt act ggt ggt agc tgc tgc tat ttt gac aac
141	AT13-035	CDR3 de cadena pesada	gcg aaa gac tgc tat tac tat ggt tgc ggg aga cga tgg ggc tac tac ttt gac tac
142	AT13-036	CDR3 de cadena pesada	gcg aga agg agg gag gtc ggt aga gat ggc tac agt ttg tac ccc gcg ggg tac cac tac ggt atg gac gtc
143	AT13-037	CDR3 de cadena pesada	gcg aga ggc cgt gga tat agt gcc caa ggg aat cgg aat agg gct tac tac ttt gac tac
144	AT12-023	CDR1 de cadena ligera	caa gga gac ttc ctc aga agc tat tat gca agc
145	AT12-025	CDR1 de cadena ligera	cgg gca agt cag agc att ag agc agt tat tta aat
146	AT13-024	CDR1 de cadena ligera	cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg ttg gcc
147	AT12-019	CDR1 de cadena ligera	cgg gcg agt cag gct tti agc agt tat tta gtc
148	AT13-022	CDR1 de cadena ligera	tct gga gat aaa ttg ggg gat aaa tat gct tgc
149	AT13-023	CDR1 de cadena ligera	cgg gca agt cag ggc att aga aat gt tta ggc
150	AT13-031	CDR1 de cadena ligera	cgg gca agt cag ggc att aga aat gat tta ggc

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
151	AT12-020	CDR1 de cadena ligera	cgg gcg agt cag gat att agc agt tct tta gcc
152	AT13-033	CDR1 de cadena ligera	act ggg acc agc gt att ggt ggt tat aac tat gtc tcc
153	AT13-034	CDR1 de cadena ligera	agg gcc agt cag agc att agc aac aac tta ggc
154	AT13-035	CDR1 de cadena ligera	caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca agc
155	AT13-036	CDR1 de cadena ligera	act gga acc agc gt gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc
156	AT13-037	CDR1 de cadena ligera	agg gcc agt cag agt gtt agc agc aac tta gcc
157	AT12-023	CDR2 de cadena ligera	ggt aaa aac aag cgg ccc tca
158	AT12-025	CDR2 de cadena ligera	gct gca tcc agt ttg caa agt
159	AT13-024	CDR2 de cadena ligera	aag gcg tct agt tta gaa agt
160	AT12-019	CDR2 de cadena ligera	gct aca tcc act ttg caa ggt
161	AT13-022	CDR2 de cadena ligera	caa gat agc aag cgg ccc tca
162	AT13-023	CDR2 de cadena ligera	gct gca tcc agt ttg caa agt
163	AT13-031	CDR2 de cadena ligera	gct gca gtc agt ttg caa agt
164	AT12-020	CDR2 de cadena ligera	gct gca tcc act ttg caa agt
165	AT13-033	CDR2 de cadena ligera	gag gtc act aag cgg ccc tca
166	AT13-034	CDR2 de cadena ligera	ggt gca tcc acc agg gcc act
167	AT13-035	CDR2 de cadena ligera	ggt aaa aac aac cgg ccc tca
168	AT13-036	CDR2 de cadena ligera	gat gtc aat gat cgg ccc tca
169	AT13-037	CDR2 de cadena ligera	ggt gca ttc acg agg gtc act
170	AT12-023	CDR3 de cadena ligera	aac tcc cgg gac cgc agt ggt aac cac ctg gfg
171	AT12-025	CDR3 de cadena ligera	caa cag agt tac agt acc cct cgc act
172	AT13-024	CDR3 de cadena ligera	caa cag tat aat act tac ccg tac act
173	AT12-019	CDR3 de cadena ligera	caa cag tat tat agt tac cct ccg act
174	AT13-022	CDR3 de cadena ligera	cag gcg tgg gac agc agc act gfg gta ttc
175	AT13-023	CDR3 de cadena ligera	cta cag cat aat agt cac ccc cgg acg

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
176	AT13-031	CDR3 de cadena ligera	cta cag cat aat agt tac cct cgg actuar
177	AT12-020	CDR3 de cadena ligera	ca cag tat tat agt tac cct cgg acg
178	AT13-033	CDR3 de cadena ligera	agc tca tat gca ggc agc aac gat ttg cta
179	AT13-034	CDR3 de cadena ligera	caa caa tat aat ag tgg cct cgg ctc act
180	AT13-035	CDR3 de cadena ligera	aac tcc cgg gac agc agt ggt aac cat gfg gta
181	AT13-036	CDR3 de cadena ligera	agc tca tat aca aga agc aac act gfg ata
182	AT13-037	CDR3 de cadena ligera	cag cag tac aat gac cgg ccc cgg tac act
183	AT12-023	Cadena pesada	cag gfg cag cta cag cag tgg ggc gca gga cta tgg ang cct tgg ang acc cta cta acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tat tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg ang ggg cta ggg tgg att ggg gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac agc tcc ang aac cag ttc tcc cta ang cta ggc tct gta acc gcc ggg gac acc gct gfg tat tac tgt ggg ang ggc ggt agt acc agc cgc gac tac tac ggg acc acc gtc acc ttc tca
184	AT12-025	Cadena pesada	cag gfg cag cta cag cag tgg ggc gca gga cta tgg ang cct tgg ang acc cta cta acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tat tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg ang ggg cta ggg tgg att ggg gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac agc tcc ang aac cag ttc tcc cta ang cta ggc tct gta acc gcc ggg gac acc gct gfg tat tac tgt ggg ang ggc ggt agt acc agc cgc gac tac tac gtc tcc tca
185	AT13-024	Cadena pesada	cag gfg cag cta cag cag tgg ggc gca gga cta tgg ang cct tgg ang acc cta cta acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tat tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg ang ggg cta ggg tgg att ggg gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac agc tcc ang aac cag ttc tcc cta ang cta ggc tct gta acc gcc ggg gac acc gct gfg tat tac tgt ggg ang ggc ggt agt acc agc cgc gac tac tac ggg cag gga acc cta gtc acc ttc tca
186	AT12-019	Cadena pesada	gag gfg cta cta cta tgg ggc gca gga cta tgg ang cct tgg ang acc cta cta acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agc agc tat tcc agt agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg ang ggg cta ggg tgg att ggg gaa atc aat cat agt gga agc acc aac agc tac gca gac tcc gfg ang ggc ggc ttc acc atc tcc aga gac aat tcc cag agc agc tgg tat cta gca atg aac agt agt agc aca gcc ggg gac acc gcc gta tat tac tgt ggg aac tct cct gct agt att cgg gga gtt agg ggg ggt gac tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc cta gtc acc ttc tca

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
202	AT13-031	Cadena ligera	gac aic eac aig acc eac tel cea tee tee eic tel gca tel gta gga gac aga gic acc aic ael lgc eeg gca agt eac ggc alt aga aat gat tta ggc lgg tat eac eac aca cea ggg aca ggc eel aag eic eic aic tal gai gca gic agt lgg cea agt ggg gic cea tea agc tic agc agt gga tel gga aca gaa tic act eic aca aic agc agc eic eac eel gaa gat tt gca act tat tac lgt eia eac cat aat agt tac eel eeg act tt ggc eac ggg acc aag eic gga aic aca
203	AT12-020	Cadena ligera	gac aic eac aig acc eac tel cea tee tee eic tel gca tel gta gga gac aga gic acc aic ael lgc eeg gca agt eac gat alt aga agt tel tta ggc lgg tat eac eac aca cea ggg aca ggc eel aag eic eic aic tal gai gca gic agt lgg cea agt ggg gic cea tea agc tic agc agt gga tel gga aca gaa tic act eic aca aic agc agc eic eac tel gaa gat tt gca act tat tac lgt caa eac gat tat aat agt tac eel eeg act tt ggc eac ggg acc aag lgg gaa aic aca
204	AT13-033	Cadena ligera	eac tel ggc eic act eac tel cea tee tee eic tel gca tel gta gga gac aga gic acc aic ael lgc eeg gca agt eac gat alt gga tel aac tal gic tee lgg tac cea eac cea ggc aca ggc cea aca lgg agt aat tat ggg gic act aag eeg cea gga gic eel gat egt tic tel ggc tee aag tel ggc aac aag ggc tee eic acc gic tel gga eic eac ggc gga gat gga gat cat tat tac lgc agc tea tal gca ggc agc aac gat lgg eia tic ggc gga ggg acc aag eic ggc aic aca
205	AT13-034	Cadena ligera	gaa gta gic aig acc eac tel cea ggc acc eic tel ggg tel cea gga gga aga ggc acc eic tee lgc agc ggc agt eac agt alt agc aac aac tta ggc lgg tat eac eac aca cea ggg aca ggc eel aag eic eic aic tal gai gca gic agt lgg cea agt ggg gic cea ggc agc tic agt ggc agt ggg tel ggg aca gga tic act eic acc aic tac agc eic eac tel gaa gat tt gca gtt tat tac lgt caa cea tal aat aac lgg eel eeg eic act tic ggc gga ggg acc aag eic ggc aic aca
206	AT13-035	Cadena ligera	tel tel ggc eic act eac tel cea ggc acc eic tel ggg tel cea gga gga eac ggc aca lgc cea gga gac agc eic aca agc tat tat gca agc lgg tac eac eac aca gga eac ggc eel gta eht gic aic tal ggt aca aac aac eeg cea gga aic cea gac ega tic tel ggc tee agc tea gga aac aca ggc tee lgg acc aic act ggg ggc eac ggc gaa gat gga gat gac tat tac lgt aac tee eeg gac agc agt ggt aac cat ggg gta tic ggc gga ggg acc aag eic ggc aic aca
207	AT13-036	Cadena ligera	eac tel ggc eic act eac tel cea ggc acc eic tel ggg tel cea gga gga eac ggc aca lgc cea gga gac agc eic aca agc gga tal aac tal gic tee lgg tac cea eac aca eic cea ggc aca ggc cea aca eic aig alt tat gat gic aat gat eeg cea gga ggt tel alt ege tic tel ggc tee aag tel ggc aac aag ggc tee eic acc aic tel gga eic eac ggc gga gat gat tat tac lgc agc tea tal aca aga aac act ggg aia tic ggc gga ggg acc aca eic ggc aic aca
208	AT13-037	Cadena ligera	gaa aia gic aig acc eac tel cea ggc acc eic tel ggg tel cea gga gga agc gic aic eic tee lgc agc ggc gca agt eac ggt agc agc aac tta ggc lgg tac eac eac aca cea ggg aca ggc eel aag eic eic aic tal gai gca gic agt lgg cea agt ggg gic cea ggc agc tic agt ggc agt ggg tel ggg aca gaa tic act eic acc aic agc agc eic eac tel gaa gat tt gca gtt tat tac lgt eac eac gat tac aat gac eeg cea eeg tac act tt ggc eac ggg acc aag eic ggc aic aca

Tabla 1B. Anticuerpos contra la AML preferidos de acuerdo con la invención (numeración de CDR de acuerdo con Kabat y otros 1991)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
209	AT14-013	CDR1 de cadena pesada	SPNWWT
210	AT14-014	CDR1 de cadena pesada	DAWMS
211	AT14-015	CDR1 de cadena pesada	DFAMS
212	AT14-016	CDR1 de cadena pesada	SYAMT
213	AT14-013	CDR2 de cadena pesada	EIYGGRRVSYNSALRS
214	AT14-014	CDR2 de cadena pesada	HINTKVDGGTTEYAAPVKG
215	AT14-015	CDR2 de cadena pesada	FIRTKANDGTTEYAASVKG
216	AT14-016	CDR2 de cadena pesada	SISGGSTYYADSVRG
217	AT14-013	CDR3 de cadena pesada	AGQKNIGCGYSSCFISWFDT
218	AT14-014	CDR3 de cadena pesada	TTEAIYDSSGYFHDI
219	AT14-015	CDR3 de cadena pesada	ASDPFMTTDYYYYYDD
220	AT14-016	CDR3 de cadena pesada	AKGYVGCSSGNCYSGGAFDI
221	AT14-013	CDR1 de cadena ligera	KSSQTILQRSNHLNYLA
222	AT14-014	CDR1 de cadena ligera	KSSRSVLYSSNNKNYLA
223	AT14-015	CDR1 de cadena ligera	TGTSSDVGGYNSVS
224	AT14-016	CDR1 de cadena ligera	GGNNIGSESVH
225	AT14-013	CDR2 de cadena ligera	WASTRES
226	AT14-014	CDR2 de cadena ligera	WASIRES
227	AT14-015	CDR2 de cadena ligera	EYKRPL
228	AT14-016	CDR2 de cadena ligera	YDIDRPS
229	AT14-013	CDR3 de cadena ligera	HQYYITPQT
230	AT14-014	CDR3 de cadena ligera	QQYSRPPT
231	AT14-015	CDR3 de cadena ligera	SSYGGTVLF
232	AT14-016	CDR3 de cadena ligera	QWWDNTSDHPVVF

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
233	AT14-013	Cadena pesada	QRLQESGPGLVKPKSETLTLTCAVSGGSSVSSPNWVTRQAPGKGLWEIGEIYYGGRVSYNSALRSRVTI SSDRSKEEFSIKLRVTAADTAIYYCAGQKNIGCGYSSCFISWFDTWGQGLAVTVSS
234	AT14-014	Cadena pesada	EVQLVSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMSWVRQAPGKGLWEVWVGHINTKVDGGTTEYAAPVKGR FTSRDSDKNSLYLHMDSLKTEDTAVYYCTTEAYDSSGYFHDYWGQGLVTVSS
235	AT14-015	Cadena pesada	EVQLVSGGGGLVQPGGSLRLSCTASGFRFGDFAMSWVRQAFGKGLWEVWVGHINTKVDGGTTEYAASVKGRF IISRDDSKSLAYLQMINSLKTEDTAVYYCASDPFMTDYYYYMDVWVGKGTTVTVSS
236	AT14-016	Cadena pesada	EVQLVSGGGSDVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMTWVTRQAPGKGLWVSSISGGSTYYADSVRGRFTISR DNSKNTLYVQMINSLRAEDTAVYYCAKGYVCGSGGNCYSGGAFDIWGGTWTVTSS
237	AT14-013	Cadena ligera	DIVMTQSPDLSAVSLGERATLACKSSGFTILQRSNHLNLAWYQQKPGQPPKVLVYWA STRESGVPPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYYCHQYTTTPTQTFGGGTVEIK
238	AT14-014	Cadena ligera	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSRSVLYSSNKNLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPPDRFSGSG SGTDFTLTINSLQAEDVAVYYCQYSRPPTEFGGTVEIK
239	AT14-015	Cadena ligera	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTCTSSDVGGSYNSVWYQHHPGKAPKLMIEVYKRPGLVPPDRFSGSKSGN TASLTVSGLQAEDAEAYYYSSYGGTVLFGGGTKLTVL
240	AT14-016	Cadena ligera	SYVLTQPPSYVAPGKTARITCGGNNIGSEVHWYQQKPGQAPVAVVYYDDDRFSGHPERFSGSNSGNTATL TISRVEAGDEADYYCQVVDNITSDHPVYVFGGKTLTVL
241	AT14-013	CDR1 de cadena pesada	agt cct aac tgg tgg act
242	AT14-014	CDR1 de cadena pesada	gac gcc tgg atg agc
243	AT14-015	CDR1 de cadena pesada	gat ttt gct atg agt
244	AT14-016	CDR1 de cadena pesada	agc tat gcc atg acc
245	AT14-013	CDR2 de cadena pesada	gaa atc tat tat ggt ggg aga gtg agc tac aac tcg gcc ctc ag contra
246	AT14-014	CDR2 de cadena pesada	cat att aac acc aaa gtt gat ggt ggg aca aca gag tac gct gca ccc gtg aaa ggc
247	AT14-015	CDR2 de cadena pesada	ttc att aga acc aaa gct aat gat ggg aca aca gaa tac gcc gcg tct gtg aaa ggc
248	AT14-016	CDR2 de cadena pesada	agt att agt ggt agt ggt agc aca tac tac gca gc tcc gtg agg ggc
249	AT14-013	CDR3 de cadena pesada	gcg ggt caa aaa aat att ggc tgt ggt tac agc agt tgc ttt att agt tgg ttc gac acc
250	AT14-014	CDR3 de cadena pesada	acc aca gag gcg ata tat gat agt agt ggt tat ttc cat gat tat

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
251	AT14-015	CDR3 de cadena pesada	gct agc gat ccc ttc atg acto aca gac tat tac tac tac atg gac gtc
252	AT14-016	CDR3 de cadena pesada	gcg aaa gga tat gfg ggg tgt agt ggt ggg aac tgc tac tgc ggg ggt ttt gat atc
253	AT14-013	CDR1 de cadena ligera	aag tcc agc cag actuar att tta caa agg tcc aac cat ttg aac tac tta gct
254	AT14-014	CDR1 de cadena ligera	aag tcc agc cgg agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct
255	AT14-015	CDR1 de cadena ligera	act ggg acc agc gt gtt ggt ggt tat aac tct gtc tcc
256	AT14-016	CDR1 de cadena ligera	ggg ggg aac aac att gga agt gaa agt gtt cac
257	AT14-013	CDR2 de cadena ligera	tgg gca tct acc cgg gaa tcc
258	AT14-014	CDR2 de cadena ligera	tgg gca tct atc cgg gaa tcc
259	AT14-015	CDR2 de cadena ligera	gag gtc tat aag cgg ccc tta
260	AT14-016	CDR2 de cadena ligera	tat gat acc gac cgg ccc tca
261	AT14-013	CDR3 de cadena ligera	cac caa tat tat act actuar ccg cag act
262	AT14-014	CDR3 de cadena ligera	cag caa tat tct cgt cct ccg acg
263	AT14-015	CDR3 de cadena ligera	edad tca tat gga ggc acc gfg cta ttc
264	AT14-016	CDR3 de cadena ligera	cag gfg tgg gat aac act to gat cct gfg gta ttc
265	AT14-013	Cadena pesada	cag ggg cga cta cag gag tgc ggc oca gga cta gta aag cct ggg ggg tcc ctt aga cta tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc gta agc agt cct aac tgg tgg act tgg gtc cgc cag gcc ccc ggg aag cta ggg tgg att gga gaa atc tat tat ggt ggg aga gfg ago tac aac tgc gcc cta agc agt cga gtc acc att tca tca gac agc tcc aca gag gag ttc tcc cta gaa cta gta agc tct gfg acc gcc ggg gac acc gcc ata tat tat tgt ggg ggt cca aca aat att ggg tgt tac age agt tgc ttt atc agt tgg ttc gac acc tgg gga cag gga att ggg gtc acc gtc tcc tca
266	AT14-014	Cadena pesada	gag gfg cag cta gfg gag tct ggg gga ggt tgg gta aag cct ggg ggg tcc ctt aga cta tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt gac gcc tgg atg agc tgg gtc cgc cag gcc oca ggg aag cta ggg tgg gtt ggc cat att aac acc aca gtt ggt ggt ggg aca aca gag tac gct gca ccc gfg aaa ggc aga ttc acc atc tca aga gat tca aaa aat tgc cta tat cta cca atg gac age cta aca acc gag gac aca gcc gta tat tac tgt acc aca gag ggg ata tat gat agt ggt tat ttc cat gac tat tgg ggc cag gga tcc cta gtc acc gtc tcc tca
267	AT14-015	Cadena pesada	gag gfg cag cta gfg gag tgc ggg gga ggc tgg gca cag oca ggg ggg tcc cta gca cta tcc tgt aca gct tct gga ttc agc ttt ggt gat ttt gct atg agt tgg gtc cgc cag gct oca ggg aag gga cta ggg tgg gta ggt ttc att aga acc aca gct aat gat ggg aca aca gaa tac gcc ggg tct gfg aaa ggc aga ttc atc tca aga gat tcc aca agt ate gcc tat cta gca aat atg aac age cta aca acc gag gac aca gcc gtt tat tac tgt gct ago gat gcc ttc atg act aca gac tat tac tac tac atg atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc agc gtc acc gtc tcc tca

(continuación)

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
268	AT14-016	Cadena pesada	gag gfg caa gfg tfg gag tct ggg gga gac tgg gta cag cct ggg ggg tcc cta aga etc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat gcc atg acc tgg gtc cgc cag gcc cca ggg aag ggg cta aaa tgg gtc tca agt att agt ggt agt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gfg ags gge cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aeg cta tat gfg cag atg aac agc cta gca gcc gag gac aag gcc gta tat tac tgt ggg aaa gga tat gfg ggg tgt agt ggt ggg aac tgc tac tgg ggg ggt gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca gfg gtc acc gtc tct tca
269	AT14-013	Cadena ligera	gac atc gfg atg acc cag tct cca gac tcc cta gct gfg tct cta ggc gag ags gcc acc atc gcc tgc aag tcc agc cag act att tta caa ags tcc aac cat tfg aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct ana gfg etc att tat tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act etc acc atc aac agc cta gct gag gat gfg gca gtu tat tac tgt cac caa tat tat act act cag act ttt ggc cag ggg acc aag gfg gag atc aaa
270	AT14-014	Cadena ligera	gac atc gfg atg acc cag tct cca gac tcc cta gct gfg tct cta ggc gag ags gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag cta etc att tac tgg gca tct atc cgg gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act etc acc atc aac agc cta gct gag gat gfg gca gtu tat tac tgt cag caa tat tct cgt cct cag aag ttc ggc caa ggg acc aag gfg gaa atc aaa
271	AT14-015	Cadena ligera	cag tct gcc cta act cag cct ccc tcc ggc tcc ggg tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc act ggg acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tct gtc tcc tgg tac caa cat cac cca ggc aaa gcc ccc aaa etc atg att tat gag gtc tat aag cgg ccc tta ggg gtc cct gat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac aag gcc tcc cta gcc acc gtc tct ggg etc cag gct gag gat gat tat tac tgc agc tca tat gga ggc acc gfg cta ttc ggc gga ggg acc aag cta
272	AT14-016	Cadena ligera	tcc tat gfg cta act cag cca ccc tca gfg tca gfg gcc cca gga aag agc gcc cgg att acc tpt ggg ggg aac aac att gga agt gaa agt gtu cac tgg tac cag cag aag cca ggc cag gcc cct gfg gfg gtc atc tat acc gac cag ccc tca ggg atc cct gag cgc ttc tct ggc tcc aac tct ggg aac aag gcc acc cta gcc acc atc agc ags gtc gaa gcc ggg gat gag gcc gac tat tac tgt cag gfg tgg gat aac act agt gat cat cct gfg gta ttc ggc gga ggg acc aag cta acc gtc cta

Tabla 2

AcM		Los AcM son específicos para la AML													Células primarias	
		Líneas celulares														
Nombre	Clase de Ig	Mel ¹	Mel ²	Mel ³	BJ	FB	Col ¹	Col ²	Col ³	Vero	HUVEC	HepG2	PBMC	BM		
AT12-019	IgG1 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
AT13-023	IgG1 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
AT13-031	IgG1 K															
AT12-020	IgG3 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
AT12-023	IgG3 λ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
AT12-025	IgG3 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
AT13-022	IgG3 λ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
AT13-024	IgG3 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Mel¹: Mel 126.2; Mel²: Mel BLM; Mel³: Mel WBO; BJ: Línea celular de fibroblastos; FB: fibroblastos primarios (piel); Col¹: Colo205; Col²: Caco-2; Col³:HT29; Vero: riñón no humano; PBMC: células mononucleares de sangre periférica; BM: médula ósea.

Tabla 3

Información general sobre los AcM específicos para la AML derivados a partir de un paciente con una respuesta GvL potente (donante 59)										
AcM				AML		AML primaria*				
Nombre	Clase de Ig	CD27	SHM V _H /V _L	THP-1	MM6	M0	M1	M1	M1	M4
AT12-019	IgG1 κ	+	10/9	++	+	+	+	++	+/-	-
AT13-023	IgG1 κ	+	8/4	++		++	+			
AT13-031	IgG1 κ	+	1/1	++	+	-	+	-	-	+/-
AT12-020	IgG3 κ	+	4/2	++						
AT12-023	IgG3 λ	-	Línea germinal/6	+++	++	+	++	++	+/-	++
AT12-025	IgG3 κ	-	1/1	++	++	-	+/-	+	-	-
AT13-022	IgG3 λ	+	Línea germinal	++		++	++			
AT13-024	IgG3 κ	-	6/3	++	++	++	++	++		

MM6: MonoMac6; M0: donante 77; M1: donante 69, 79, 86 respectivamente; M4: donante 78
 * AML de acuerdo con la clasificación FAB; SHM: número de hipermutaciones somáticas

Tabla 4

Algunos AcM se unen a otros tumores hematológicos							
AcM		Otras líneas celulares tumorales hematológicas				Tumores primarios	
Nombre	Clase de Ig	OCI-Ly1	OCI-Ly7	U266	NCI-H929	NHL pt	ALL pt
AT12-019	IgG1 κ	+	-	-	-	-	-
AT13-023	IgG1 κ						
AT13-031	IgG1 κ	++	+	-	+/-	++	-
AT12-020	IgG3 κ						
AT12-023	IgG3 λ	-	-	+/-	-	++	-
AT12-025	IgG3 κ	-	-	+	-	-	-
AT13-022	IgG3 λ						
AT13-024	IgG3 κ	++	+	-	-	-	-

OCI-Ly1 y OCI-Ly7: líneas celulares de linfoma difuso de células B grandes; U266 y NCI-H929: líneas celulares de mieloma múltiple; NHL pt: células de linfoma no Hodgkin B recién aisladas a partir de un paciente recién diagnosticado; ALL pt: células de leucemia linfática aguda B recién aisladas a partir de un paciente recién diagnosticado.

Tabla 5

Algunos AcM muestran actividad <i>in vitro</i>						
AcM				Muerte		
Nombre	Clase de Ig	CD27	SHM V _H /V _L	THP-1	M0/5	
AT12-019	IgG1 κ	+	10/9	no	no	
AT13-023	IgG1 κ	+	8/4			
AT13-031	IgG1 κ	+	1/1			
AT12-020	IgG3 κ	+	4/2			
AT12-023	IgG3 λ	-	Línea germinal/6	sí		

(continuación)

Algunos AcM muestran actividad <i>in vitro</i>					
AcM				Muerte	
Nombre	Clase de Ig	CD27	SHM V _H /V _L	THP-1	M0/5
AT12-025	IgG3 κ	-	1/1	sí	sí
AT13-022	IgG3 λ	+	Línea germinal		
AT13-024	IgG3 κ	-	6/3	no	sí

AT13-023, AT13-031, AT12-020 y AT13-022 aún no se probaron para la actividad *in vitro*

Tabla 6

2do paciente con AML con respuesta GvL (donante 58)									
AcM				AML		No se une a			
Clon	CD27	Clase de Ig	SHM V _H /V _L	THP-1	MM6	PBMC	Caco	HT-29	HepG2
AT13-033	+	IgG3 λ	18/5	++	++	-	-	-	-
AT13-034	+	IgG3 κ	14/6	++	++	-	-	-	-
AT13-035	-	IgG3 λ	0/0	++	++	-	-	-	-
AT13-036	-	IgG3 λ	4/9	++	++	-	-	-	-
AT13-037	+	IgG3 κ	4/8	++	++	-	-	-	-

SHM: número de hipermutaciones somáticas.

Tabla 7

Información general de AcM específicos para la AML derivados a partir de un 3 ^{er} paciente con una respuesta GvL potente (donante 101)									
AcM				AML		AML primaria*			
Nombre	Clase de Ig	CD27	SHM V _H /V _L	THP-1	Molm13	M0	M4	M5 ¹	M5 ²
AT14-013	IgG1 κ	+	26/11	+++	+++	+++	++	+/-	+
AT14-014	IgG3 κ	+	9/6	++	++	-	-	-	-
AT14-015	IgG3 λ	+	9/9	++	-	-	+	-	-
AT14-016	IgG3 λ	+	9/5	++	++	-	+	-	-

M1: donante 77; M4: donante BL-046; M5¹: donante BL-034, M5²: donante BL-038
* AML de acuerdo con la clasificación FAB; SHM: número de hipermutaciones somáticas

Tabla 8

Los AcM son específicos para la AML (donante 101)										
AcM		Líneas celulares				PBMC				Células primarias
Nombre	Clase de Ig	FB	Col	Liv ¹	Liv ²	CD3	CD14	CD19	CD56	Células de hígado fetal
AT14-013	IgG1 κ	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
AT14-014	IgG3 κ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT14-015	IgG3 λ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT14-016	IgG3 λ	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FB: fibroblastos primarios (piel); Col: Caco-2; Liv¹: Línea celular hepática Huh7; Liv²: Línea celular hepática HepG2
PBMC: células mononucleares de sangre periférica;

Tabla 9A

Información general de AcM específicos para la AML derivados a partir de un 2 ^{do} paciente con una respuesta GvL potente (donante 58)									
AcM				AML		AML primaria*			
Clon	CD27	Clase de Ig	SHM V _H /V _L	THP-1	MM6	M0	M0	M1	M4
AT13-033	+	IgG3 λ	18/5	++	++	-	-	-	-
AT13-034	+	IgG3 κ	14/6	++	++	+/-	-	-	-
AT13-035	-	IgG3 λ	0/0	++	++	-	-	-	-
AT13-036	-	IgG3 λ	4/9	++	++	-	-	-	-
AT13-037	+	IgG3 κ	4/8	++	++	-	-	-	-

MM6: MonoMac6; M0: donante 77, BL-030; M1 donante 69, respectivamente; M4 donante 78
 * AML de acuerdo con la clasificación FAB; SHM: número de hipermutaciones somáticas

Tabla 9B

Algunos AcM muestran actividad <i>in vitro</i> (donante 59)						
AcM					Muerte	
Nombre	Clase de Ig	CD27	SHM V _H /V _L	THP-1	M1	
AT12-019	IgG1 κ	+	10/9	no	no	
AT13-023	IgG1 κ	+	8/4	no	nd	
AT13-031	IgG1 κ	+	1/1	sí*	nd	
AT12-020	IgG3 κ	+	4/2	nd	nd	
AT12-023	IgG3 λ	-	Línea germinal/6	sí	nd	
AT12-025	IgG3 κ	-	1/1	sí	sí	
AT13-022	IgG3 λ	+	Línea germinal	no	nd	
AT13-024	IgG3 κ	-	6/3	no	sí	

*Sólo a 37 °C; nd = no determinada

Tabla 10

Algunos AcM muestran actividad <i>in vitro</i> (donante 58)					
AcM				Muerte	
Clon	CD27	Clase de Ig	SHM V _H /V _L	THP-1	
AT13-033	+	IgG3 λ	18/5	sí	
AT13-034	+	IgG3 κ	14/6	no	
AT13-035	-	IgG3 λ	0/0	sí	
AT13-036	-	IgG3 λ	4/9	sí	
AT13-037	+	IgG3 κ	4/8	sí	

Referencias

Bakker AB, van den Oudenrijn S, Bakker AQ, Feller N, van Meijer M, Bia JA, Jongeneelen MA, Visser TJ, Bijl N, Geuijen CA, Marissen WE, Radosevic K, Throsby M, Schuurhuis GJ, Ossenkoppele GJ, de Kruif J, Goudsmit J, Kruisbeek AM. 2004. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 64:8443-50.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33:451-458.

- Bhat NM, Bieber MM, Hsu FJ, Chapman CJ, Spellerberg M, Stevenson FK, Teng NNH. 1997. Rapid cytotoxicity of human B lymphocytes induced by VH4-34 (VH4.21) gene-encoded monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 108: 151-159.
- 5 Biernacki MA, Marina O, Zhang W, Liu F, Bruns I, Cai A, Neuberg D, Canning CM, Alyea EP, Soiffer RJ, Brusic V, Ritz J, Wu CJ. 2010. Efficacious immune therapy in chronic myelogenous leukemia (CML) recognizes antigens that are expressed on CML progenitor cells. *Cancer Research* 70:906-915.
- 10 Chen Y, Wiesmann C, Fuh G, Li B, Christinger HW, McKay P, de Vos AM, Lowman HB. 1999. Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J Mol Biol* 293:865-881.
- 15 Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, van Haren SD, Kwakkenbos MJ, Yasuda E, Beaumont T, Scheeren FA, Spits H. 2008. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J Immunol* 180:4805-4815.
- Drexler HG, Minowada J. 1998. History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma* 31:305-316.
- 20 Hernandez AM, Rodriguez N, Gonzalez JE, y otros Anti-NeuGcGM3 Antibodies, Actively Elicited by Idiotypic Vaccination in Non-small Cell Lung Cancer Patients, Induce Tumor Cell Death by an Oncosis-Like Mechanism. *J Immunol* 2011; 186(6):3735-3744.
- 25 Hugh J. M et al, 2004 *Methods in Molecular Biology* Vol. 282 Kattah NH, Kattah MG, Utz PJ. The U1-snRNP complex: structural properties relating to autoimmune pathogenesis in rheumatic diseases. *Immunol Reviews*. 2010;233(1):126-145.
- Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011;1-17.
- 30 Kwakkenbos MJ, Diehl SA, Yasuda E, Bakker AQ, Van Geelen CMM, Lukens MV, Van Bleek GM, Widjoatmodjo MN, Bogers WMJM, Mei H, Radbruch A, Scheeren FA, Spits H, Beaumont T. 2010. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat Med* 16:123-128.
- 35 Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, Van Rooijen N, Weissman IL. 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138:286-299.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H, German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. 2008. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358:1909-1918.
- 40 Schmid C, Labopin M, Nagler A, Bornhäuser M, Finke J, Fassas A, Volin L, Gürman G, Maertens J, Bordignon P, Holler E, Ehninger G, Polge E, Gorin N-C, Kolb H-J, Rocha V, EBMT Acute Leukemia Working Party. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *Journal of Clinical Oncology* 25:4938-4945.
- 45 Schmiedel BJ, Werner A, Steinbacher J, y otros Generation and Preclinical Characterization of a Fc-optimized GTR-Ig Fusion Protein for Induction of NK Cell Reactivity Against Leukemia. *Mol Ther*. 2013;21(4):877-886.
- 50 Singh R, Cadeddu R-P, Fröbel J, y otros The non-steroidal anti-inflammatory drugs Sulindac sulfide and Diclofenac induce apoptosis and differentiation in human acute myeloid leukemia cells through an AP-1 dependent pathway. *Apoptosis*. 2011;16(9):889-901.
- 55 Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno K, Tada K. 1988. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26:171-176.
- Walter RB, Appelbaum FR, Estey EH, Bernstein ID. Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. 2012. *Blood* 119: 6198-208.
- 60 Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, Wang J, Contreras-Trujillo H, Martin R, Cohen JD, Lovelace P, Scheeren FA, Chao MP, Weiskopf K, Tang C, Volkmer AK, Naik TJ, Storm TA, Mosley AR, Edris B, Schmid SM, Sun CK, Chua MS, Murillo O, Rajendran P, Cha AC, Chin RK, Kim D, Adorno M, Raveh T, Tseng D, Jaiswal S, Enger PØ, Steinberg GK, Li G, So SK, Majeti R, Harsh GR, van de Rijn M, Teng NN, Sunwoo JB, Alizadeh AA, Clarke MF, Weissman IL. 2012. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6662-7.
- 65

Wu CJ, Yang XF, McLaughlin S, Neuberg D, Canning C, Stein B, Alyea EP, Soiffer RJ, Dranoff G, Ritz J. 2000. Detection of a potent humoral response associated with immune-induced remission of chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 106:705-714.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humano aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este, que puede unirse al snRNP200 de células de leucemia mieloide aguda (AML) y que puede disminuir la proliferación de las células de AML por oncosis.
- 10 2. Un anticuerpo aislado, sintético o recombinante, o una parte funcional de este capaz de unirse al snRNP200 de células de AML y disminuir la proliferación de células de AML, que comprende:
 - una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, tal como se define por la SEQ ID NO: 1, 14, 27, 40, 53 y 66, respectivamente, o secuencias que muestran al menos un 90 % de identidad con ellas;
 - una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, tal como se define por la SEQ ID NO: 2, 15, 28, 41, 54 y 67, respectivamente, o secuencias que muestran al menos un 90 % de identidad con ellas;
 - una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, tal como se define por la SEQ ID NO: 7, 20, 33, 46, 59 y 72, respectivamente, o secuencias que muestran al menos un 90 % de identidad con ellas;
 - una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, tal como se define por la SEQ ID NO: 9, 22, 35, 48, 61 y 74, respectivamente, o secuencias que muestran al menos un 90 % de identidad con ellas;
 - una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, tal como se define por la SEQ ID NO: 11, 24, 37, 50, 63 y 76, respectivamente, o secuencias que muestran al menos un 90 % de identidad con ellas; o
 - una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, tal como se define por la SEQ ID NO: 13, 26, 39, 52, 65 y 78, respectivamente, o secuencias que muestran al menos un 90 % de identidad con ellas.
- 30 3. Un anticuerpo o una parte funcional de este de conformidad con la reivindicación 2, que comprende una secuencia variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 79, 80, 85, 87, 89 y 91, y/o que comprende una secuencia variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 92, 93, 98, 100, 102 y 104.
- 35 4. Un anticuerpo o una parte funcional de este de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que se acopla a otro compuesto, preferentemente en donde dicho otro compuesto es un marcador detectable, un fármaco quimioterapéutico, un resto tóxico, una molécula inmunomoduladora, otro compuesto de unión específica para la AML, o un compuesto radiactivo.
- 40 5. Una molécula de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, que codifica al menos la secuencia variable de cadena pesada y/o la secuencia variable de cadena ligera de un anticuerpo o una parte funcional de este de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, preferentemente en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 183, 184, 189, 191, 193 y 195, y/o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 196, 197, 202, 204, 206 y 208.
- 45 6. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 5.
- 50 7. Una célula aislada o recombinante, o un animal no humano, que comprende una molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 5 o un vector de conformidad con la reivindicación 6.
- 55 8. Una composición que comprende un anticuerpo o una parte funcional de este de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 5, o un vector de conformidad con la reivindicación 6, o una célula de conformidad con la reivindicación 7, preferentemente en donde dicha composición es una composición farmacéutica que comprende un portador, diluyente o excipiente aceptable farmacéuticamente, con mayor preferencia en donde dicha composición farmacéutica comprende al menos dos anticuerpos o partes funcionales de estos de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 60 9. Un anticuerpo o una parte funcional de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 5, o un vector de conformidad con la reivindicación 6, o una célula de conformidad con la reivindicación 7, para su uso como un medicamento o agente profiláctico.
- 65 10. Un anticuerpo o una parte funcional de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 5, o un vector de conformidad con la reivindicación 6, o una célula de conformidad con la reivindicación 7, para su uso en un método para al menos en parte tratar o prevenir

la leucemia mieloide (AML) o el linfoma no Hodgkin B (B-HNL) o para el uso en el diagnóstico de la AML o el B-HNL.

- 5 11. El uso de un anticuerpo o una parte funcional de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 5, o un vector de conformidad con la reivindicación 6, o una célula de conformidad con la reivindicación 7, para determinar si una muestra comprende células de AML o células de linfoma no Hodgkin B.
- 10 12. Un método para producir un anticuerpo o una parte funcional de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende proporcionar una célula con una molécula de ácido nucleico o un vector de conformidad con la reivindicación 5 o 6, y permitir que dicha célula traduzca dicha molécula de ácido nucleico o vector, lo que produce de esta manera dicho anticuerpo o una parte funcional de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, el método comprende además preferentemente cosechar, purificar y/o aislar dicho anticuerpo o parte funcional.
- 15 13. Un método para determinar si una célula mieloide o una célula linfoide es una célula de leucemia mieloide (AML) o linfoma no Hodgkin B (B-HNL), el método comprende determinar si el snRNP200 está presente sobre la superficie de dicha célula, en donde la presencia del snRNP200 sobre la superficie de dicha célula indica que dicha célula es una célula de AML o B-HNL.
- 20 14. Un método para determinar si las células de AML o B-HNL están presentes en una muestra que comprende:
 - poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo o una parte funcional de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y
 - permitir que dicho anticuerpo o parte funcional se una a las células mieloproliferativas o linfoproliferativas, si están presentes, y
 - determinar si las células AML o B-HNL se unen o no a dicho anticuerpo o parte funcional o, de esta manera, determinar si las células AML o B-HNL están o no presentes en dicha muestra.
- 25 15. Un método para determinar si un individuo padece un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo, en donde dicho trastorno mieloproliferativo es AML y en donde dicho trastorno linfoproliferativo es linfoma no Hodgkin B, y comprende determinar si una muestra de dicho individuo comprende anticuerpos específicos para el snRNP200, preferentemente en donde el método comprende:
 - poner en contacto una muestra de dicho individuo con el snRNP200 o un epítipo de este;
 - permitir que dicho snRNP200 o epítipo se una a anticuerpos específicos de snRNP200 de dicha muestra, si está presente, y
 - determinar si dicho snRNP200 o epítipo se une o no a anticuerpos específicos para el snRNP200, en donde la unión de dicho snRNP200 o epítipo a anticuerpos específicos para el snRNP200 indica que dicho individuo padece dicho trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo.
- 30 16. Un método para determinar si un paciente que padece de un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo tiene una probabilidad mejorada de un resultado positivo del tratamiento con un anticuerpo específico o una parte funcional para el snRNP200, en comparación con la población media de pacientes que padecen un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo, el método comprende determinar si el snRNP200 está presente sobre la superficie de las células mieloproliferativas o las células linfoproliferativas de dicho paciente, el método comprende:
 - poner en contacto una muestra que contiene células mieloproliferativas o células linfoproliferativas a partir de dicho individuo con un anticuerpo o una parte funcional que es específica para el snRNP200;
 - permitir que dicho anticuerpo o parte funcional se una a las células mieloproliferativas o linfoproliferativas de dicha muestra, y
 - determinar si dicho anticuerpo o parte funcional específica para el snRNP200 se une a células mieloproliferativas o células linfoproliferativas de dicha muestra, en donde la unión de dicho anticuerpo o parte funcional específica para el snRNP200 a células mieloproliferativas o células linfoproliferativas de dicha muestra indica que dicho paciente tiene una probabilidad mejorada de un resultado positivo del tratamiento con un anticuerpo o una parte funcional específica para el snRNP200, en comparación con la población media de pacientes que padecen un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo, en donde dicho trastorno mieloproliferativo es la AML y en donde dichas células mieloproliferativas son células de AML, o en donde dicho trastorno linfoproliferativo es linfoma no Hodgkin B y en donde dichas células linfoproliferativas son células de linfoma no Hodgkin B.
- 35 40 45 50 55 60 17. El uso de un anticuerpo o parte funcional de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para determinar si un paciente con AML tiene una respuesta injerto contra leucemia.

FIG. 1

Panel de anticuerpos para la AML de AIMM Therapeutics

NB: numeración de CDR de acuerdo con Kabat y otros (1991)

AT12-023 (11C9-22C11)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV4-34*01 F
IGHD2-2*01 F
IGHJ6*03 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF
CDR1 GYYWS
Fw2 WIRQPPGKGLEWIG
CDR2 EINHSGSTNYPNPKLS
Fw3 RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
CDR3 GRSTSPLDYYYYYMDV
Fw4 WAKGTTVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc
gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt

CDR1 ggt tac tac tgg agc

Fw2 tgg atc cgc cag ccc oca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg

CDR2 gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt

Fw3 cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc
gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg agg

CDR3 ggc cgt agt acc agc ccg ctc gac tac tac tac tac atg gac gtc

Fw4 tgg gcc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGLV3-19*01 F
IGLJ3*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 SSELTDPAVSVVALGQTVRITC
CDR1 QGDFLRSYYS
Fw2 WYQKPGQAPVLFVIF
CDR2 GKNKRPS
Fw3 GIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC
CDR3 NSRDRSGNHLV
Fw4 FGGTKLTVL

NUCLEÓTIDO:

Fw1 tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc

CDR1 caa gga gac ttc ctc aga agc tat tat gca agc

Fw2 tgg tac cag cag aag oca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc ttt

CDR2 ggt aaa aac aag cgg ccc tca

Fw3 ggg atc oca gac cga ttc tct ggc tcc agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct
cag gcg gaa gat gag gct gac tat tac tgt

CDR3 aac tcc cgg gac cgc agt ggt aac cac ctg gtg

Fw4 ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

AT12-025 (14D3-12D5)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV4-34*01 F
IGHD1-1*01 F
IGHJ4*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF
CDR1 GYYWS
Fw2 WIRQPPGKGLEWIG
CDR2 EINHSGSTNYNPSLKS
Fw3 RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
CDR3 GSMARPKPFDY
Fw4 WGQGLVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tgg gag acc ctg tcc ctc acc tgc
gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt

CDR1 ggt tat tac tgg agc

Fw2 tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg

CDR2 gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac cgg tcc ctc aag agt

Fw3 cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc
gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga

CDR3 ggc tca atg gca aga ccc aag cca ttt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGKV1-39*01 F
IGKJ3*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
CDR1 RASQISRYLN
Fw2 WYQQKPGKAPKLLIY
CDR2 AASSLQS
Fw3 GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
CDR3 QQSYPSTPRT
Fw4 FGPGTKVDIK

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act
tgc

CDR1 cgg gca agt cag agc att agc agg tat tta aat

Fw2 tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tat

CDR2 gct gca tcc agt ttg caa agt

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg
caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt

CDR3 caa cag agt tac agt acc cct cgc act

Fw4 ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa

AT13-024 (15H3-10F7)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-30*02 F
IGHD3-22*01 F
IGHJ4*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
CDR1 SYGMH
Fw2 WVRQAPGKGLEWVA
CDR2 FIRYDGSNKYFADSVRG
Fw3 RFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAK
CDR3 DPQERIYYSDTSGYLDY
Fw4 WGQGLVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcg tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 agc tat ggc atg cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca

CDR2 ttt ata cgg tat gat gga agt aat aaa tac ttt gca gac tcc gtg agg ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt ctg caa atg aac agc ctg aga gct
gag gac acg gct gtg tat tac tgt

CDR3 gcg aaa gat ccc caa gag cgt att tat tac tct gat act agt ggt tac ctt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGKV1-5*03 F
IGKJ2*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 DIQMTQSPSTLSASVGRVTITC
CDR1 RASQSISSWLA
Fw2 WYQQKPGKAPKLLIY
CDR2 KASSLES
Fw3 GVPSRFRSGTSGTEFTLTISSLQPDFATYYC
CDR3 QQYNTYPYT
Fw4 FGQGTKLEIK

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act
tgc

CDR1 cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg ttg gcc

Fw2 tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tat

CDR2 aag gcg tct agt tta gaa agt

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc act gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg
cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgc

CDR3 caa cag tat aat act tac ccg tac act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa

AT12-019 (1B3-15E2)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-23*01 F
IGHD3-10*01 F
IGHJ4*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 EVHLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
CDR1 SYAMS
Fw2 WVRQAPGKGLEWVS
CDR2 TIRASGGSTSYADSVKG
Fw3 RFTISRDNQSRLYLQMNSLTAEDTAVYYCAK
CDR3 SPAMIRGVRRGGDYFDY
Fw4 WQQGTLVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gag gtg cac ctg ttg gag tct ggg gga gcc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttt agc

CDR1 agc tat gcc atg agt

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca

CDR2 act att agg gct agt ggt ggt agc aca agc tac gca gac tcc gtg aag ggc

Fw3 cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc cag agc agg ttg tat ctg caa atg aac agt ctg aca gcc
gag gac acg gcc gta tat tac tgt gcg aaa

CDR3 tct cct gct atg att cgg gga gtt agg ggg ggt gac tac ttt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGKV1-8*01 F
IGKJ2*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 AIRLTQSPSSVSASTGDRVTITC
CDR1 RASQAFSSYLV
Fw2 WYQQKPGKAPNLLIY
CDR2 ATSTLQG
Fw3 GVPSRFRSGSGGTDFLTISNLSQSEDFATYYC
CDR3 QQYYSYPPT
Fw4 FGQGTKLEIK

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gcc atc cgg ttg acc cag tct cca tcc tca gtc tct gca tct aca gga gac aga gtc acc atc act
tgt

CDR1 cgg gcg agt cag gct ttt agc agt tat tta gtc

Fw2 tgg tat cag caa aaa cca ggg aaa gcc cct aac ctc ctg atc tac

CDR2 gct aca tcc act ttg caa ggt

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc aac ctg
cag tct gaa gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 caa cag tat tat agt tac cct ccg act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag ttg gag atc aaa

AT13-022 (8H11-6P4)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-30*03 F
IGHD2-15*01 F
IGHJ6*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
CDR1 SYGMH
Fw2 WVRQAPGKGLEWVAV
CDR2 ISYDGSNKYYADSVKG
Fw3 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
CDR3 DGKGIIVVIYYYYGMDV
Fw4 WGQGTITVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 agc tat ggc atg cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt

CDR2 ata tca tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct
gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aaa

CDR3 gat ggg aag ggg att gta gtt att tac tac tac tac ggt atg gac gtc

Fw4 tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGLV3-1*01 F
IGLJ2*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
CDR1 SGDKLGDKYAC
Fw2 WYQQKPGQSPVLVIY
CDR2 QDSKRPS
Fw3 GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC
CDR3 QAWDSSTVVF
Fw4 GGGTKLTVL

NUCLEÓTIDO:

Fw1 tcc tat gag ctg act cag cca ccc tca gtg tcc gtg tcc cca gga cag aca gcc agc atc acc tgc

CDR1 tct gga gat aaa ttg ggg gat aaa tat gct tgc

Fw2 tgg tat cag cag aag cca ggc cag tcc cct gtg ctg gtc atc tat

CDR2 caa gat agc aag cgg ccc tca

Fw3 ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc aac tct ggg aac aca gcc act ctg acc atc agc ggg acc
cag gct atg gat gag gct gac tat tac tgt

CDR3 cag gcg tgg gac agc agc act gtg gta ttc

Fw4 ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

AT13-023 (19G7-8L15)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV4-34*12 F
IGHD2-2*01 F
IGHJ4*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF
CDR1 GYFWT
Fw2 WIRQPPGKGLEWIG
CDR2 ETVHSGGTNYPNPSLKS
Fw3 RVTISVDTSKNQFSLRLNSVTAADTAVYYCVR
CDR3 GLNSPFDY
Fw4 WGQGLTIVTSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag gta cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tgg gag acc ctg tcc ctc acc tgc
gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt

CDR1 ggt tac ttc tgg acc

Fw2 tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg

CDR2 gaa acc gtt cat agt gga ggc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt

Fw3 cga gtc acc ata tca gtc gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg agg ctg aac tct gtg acc gcc
gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gtg aga

CDR3 ggc ctt aac agc ccc ttt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc cta gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGKV1-17*01 F
IGKJ1*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
CDR1 RASQGIRNVLG
Fw2 WYQQKPKGKAPKCLY
CDR2 AASSLQS
Fw3 GVPSRFRSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC
CDR3 LQHNSHPRT
Fw4 FGQGTKVEIK

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act
tgc

CDR1 cgg gca agt cag ggc att aga aat gtt tta ggc

Fw2 tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag tgc ctg atc tat

CDR2 gct gca tcc agt ttg caa agt

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc agc agc ctg
cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 cta cag cat aat agt cac ccc cgg acg

Fw4 ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa

AT13-031 (6G6-2I10)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV4-34*01 F
IGHD6-6*01 F
IGHJ4*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSF
CDR1 GYYWS
Fw2 WIRQPPGKGLEWIG
CDR2 EINHSGSTNYPNPSLKS
Fw3 RVTISVDTSKKQFSLKLSVTAADTAVYYCAR
CDR3 GPRGMYSSSSGDY
Fw4 WGQGLVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc
gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt

CDR1 ggt tac tac tgg agc

Fw2 tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg

CDR2 gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag agt

Fw3 cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aag cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc
ggc gac acg gct gtg tat tat tgt gcg aga ggc

CDR3 ccc cgg ggc atg tat agc agc tcg tcc ggg gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGKV1-17*01 F
IGKJ2*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
CDR1 RASQGIRNDLG
Fw2 WYQKPGKAPKRLIY
CDR2 AAVSLQS
Fw3 GVPSRFSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC
CDR3 LQHNSYPRT
Fw4 FGQGTKLEIK

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act
tgc

CDR1 cgg gca agt cag ggc att aga aat gat tta ggc

Fw2 tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag cgc ctg atc tat

CDR2 gct gca gtc agt ttg caa agt

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc agc agc ctg
cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 cta cag cat aat agt tac cct cgg act

Fw4 ttt ggc cag ggc acc aag ctg gag atc aaa

AT12-020 (1B3-13C8)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-21*01 F
IGHD1-26*01 F
IGHJ6*03 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFS
CDR1 TYSMN
Fw2 WVRQAPGKGLEWVS
CDR2 SSSSSGYIYYADSVKG
Fw3 RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
CDR3 DGTFSYIYYMDV
Fw4 WGKGTITVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 acc tat agc atg aac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca

CDR2 tcc att agt agt agt agt ggt tac ata tac tac gca gac tca gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc
gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga

CDR3 gat ggg act ttc tcc tac tac tac tac atg gac gtc

Fw4 tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGKV1-8*01 F
IGKJ1*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 AIRMTQSPSSFSASTGDRVITIC
CDR1 RASQDISSSLA
Fw2 WYQQKPGKAPKLLIY
CDR2 AASTLQS
Fw3 GVPSTRFSGSGGTDFTLTISCLQSEDFATYYC
CDR3 QQYYSYPPT
Fw4 FGQGTRLEIK

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gcc atc cgg atg acc cag tct cca tcc tca ttc tct gca tct aca gga gac aga gtc acc atc act
tgt

CDR1 cgg gcg agt cag gat att agc agt tct tta gcc

Fw2 tgg tat cag caa aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tat

CDR2 gct gca tcc act ttg caa agt

Fw3 gga gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc tgc ctg
cag tct gaa gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 caa cag tat tat agt tac cct ccg acg

Fw4 ttc ggc caa ggg acc agg ttg gaa atc aaa

AT13-033 (7H10-2A4)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-30*03 F
IGHD4-23*01 ORF
IGHJ6*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGLSFR
CDR1 NYGMH
Fw2 WVRQAPGKGLEWVA
CDR2 VISHDGSKTYYGHSVKG
Fw3 RFTISRDKSKTMLFLQMNSLRPEDTAVYYCAK
CDR3 AGLNYYGNLLSNFYFYGM DV
Fw4 WGQGTTVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gtc tct gga ctc agt ttc agg

CDR1 aat tat ggc atg cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct ccc ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca

CDR2 gtc att tcg cat gat gga agt aag aca tac tat gga cac tcc gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc ata tcc aga gac aaa tcc aag act atg ttg ttt ctc caa atg aac agc ctg aga cct
gag gac acg gct gtt tat tac tgt gcg aaa

CDR3 gcc ggg ttg aac tac tat gga aac cta tta tca aac tac ttc tac tac gga atg gac gtc

Fw4 tgg ggc caa ggg acc aca gtc acc gtc tcg tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGLV2-8*01 F
IGLJ2*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QSALTQPPSASGSPGQSVTISC
CDR1 TGTSSDIGGNYYS
Fw2 WYQHHPGKAPKLMYI
CDR2 EVTKRPS
Fw3 GVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEAHYYC
CDR3 SSYAGSNDLL
Fw4 FGGGTKLTVL

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag tct gcc ctg act cag cct ccc tcc gcg tcc ggg tct cct ggt cag tca gtc acc atc tcc tgt

CDR1 act ggg acc agc agt gac att ggt ggt tat aac tat gtc tcc

Fw2 tgg tac caa cac cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ttg atg att tat

CDR2 gag gtc act aag cgg ccc tca

Fw3 ggg gtc cct gat cgt ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc gtc tct gga ctc
cag gct gag gat gag gct cat tat tac tgc

CDR3 agc tca tat gca ggc agc aac gat ttg cta

Fw4 ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc ctg

AT13-034 (7H10-4F9)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-33*01 F
IGHD2-15*01 F
IGHJ4*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QVHLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASEFTFS
CDR1 SHAIH
Fw2 WVRQAPGKGLEWVA
CDR2 LIWYDGSNNYYADSVKG
Fw3 RFTISRDSKNTVHLQMNSLRVEDTAVYYC
CDR3 ARDGCTGGSCCYFDN
Fw4 WGQGTLVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag gtg cac ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg acg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcg tct gaa ttc acc ttc agt

CDR1 tcc cat gcc ata cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca

CDR2 ctt ata tgg tat gat gga agt aat aat tat tat gca gac tcc gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag aac acg gtg cat ctg caa atg aac agc ctg aga gtc
gag gac acg gct gtg tat tac tgt

CDR3 gcg aga gat ggt tgt act ggt ggt agc tgc tgc tat ttt gac aac

Fw4 tgg ggc cag gga acc cta gtc acc gtc tcc tcg

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGKV3-15*01 F
IGKJ4*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 EVVMTQSPATLSVSPGERATLSC
CDR1 RASQISISNLLG
Fw2 WYQQKPGQAPRLLIY
CDR2 GASTRAT
Fw3 GIPGRFSGSGTEFTLTIYSLQSEDFAVYYC
CDR3 QQYNNWPRLT
Fw4 FGGGTKVEIK

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gaa gta gtg atg acg cag tct cca gcc acc ctg tct gtg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc
tgc

CDR1 agg gcc agt cag agc att agc aac aac tta ggc

Fw2 tgg tat cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tac

CDR2 ggt gca tcc acc agg gcc act

Fw3 ggt atc cca ggc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gag ttc act ctc acc atc tac agc ctg
cag tct gag gat ttt gca gtt tat tac tgt

CDR3 caa caa tat aat aac tgg cct cgg ctc act

Fw4 ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa

AT13-035 (19C7-2F8)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-30*03 F
IGHD3-10*01 F
IGHJ4*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
CDR1 SYGMH
Fw2 WVRQAPGKGLEWVA
CDR2 VISYDGSNKYYADSVKG
Fw3 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
CDR3 AKDSYYYGSGRRWGYFDY
Fw4 WQGTLVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 agc tat ggc atg cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca

CDR2 gtt ata tca tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct
gag gac acg gct gtg tat tac tgt

CDR3 gcg aaa gac tcg tat tac tat ggt tcg ggg aga cga tgg ggc tac tac ttt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGLV3-19*01 F
IGLJ2*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 SSELTQDPAVSVALGQTVRITC
CDR1 QGDSLRSYYAS
Fw2 WYQKPGQAPVLIY
CDR2 GKNNRPS
Fw3 GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC
CDR3 NSRDSSGNHVV
Fw4 FGGTKLTVL

NUCLEÓTIDO:

Fw1 tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc

CDR1 caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca agc

Fw2 tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc tat

CDR2 ggt aaa aac aac cgg ccc tca

Fw3 ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct
cag gcg gaa gat gag gct gac tat tac tgt

CDR3 aac tcc cgg gac agc agt ggt aac cat gtg gta

Fw4 ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

AT13-036 (12C2-5F6)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-21*01 F
IGHD5-24*01 ORF
IGHJ6*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
CDR1 SYSMN
Fw2 WVRQAPGKGLEWVS
CDR2 SSSSSTIYYADSVKG
Fw3 RFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
CDR3 ARREVGRDGYSLYPRGYHYGMDV
Fw4 WQGGTTVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 agt tat agc atg aac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca

CDR2 tcc att agt agt agt agt act tac ata tac tac gca gac tca gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc agg aac tca ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc
gag gac acg gct gtg tat tat tgt

CDR3 gcg aga agg agg gag gtc ggt aga gat ggc tac agt ttg tac ccc cgg ggg tac cac tac ggt atg
gac gtc

Fw4 tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGLV2-14*01 F
IGLJ2*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QSALTQPASVSGSPRQSITISC
CDR1 TGTSSDVGNYVS
Fw2 WYQLPGKAPKLMYI
CDR2 DVNDRPS
Fw3 GVSIRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
CDR3 SSYTRSNTVI
Fw4 FGGGTKLTVL

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg tct ggg tct cct aga cag tgg atc acc atc tcc tgc

CDR1 act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc

Fw2 tgg tac caa caa ctc cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat

CDR2 gat gtc aat gat cgg ccc tca

Fw3 ggg gtt tct att cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct ggg ctc
cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc

CDR3 agc tca tat aca aga agc aac act gtg ata

Fw4 ttc ggc gga ggg acc aaa ctg acc gtc cta

AT13-037 (3G11-5E3)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-33*01 F
IGHD5-12*01 F
IGHJ4*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
CDR1 TYGMH
Fw2 WVRQAPGKGLEWVA
CDR2 VIWYDGSNTYYADSVKG
Fw3 RFTISRDNKNTLYLQIKSLRAEDTAVYYC
CDR3 ARGRGYSAQGNRRRAYFFDY
Fw4 WGQGTLVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcg tct gga ttc acc ttc agt

CDR1 acc tat ggc atg cac

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctt gag tgg gtg gca

CDR2 gtt ata tgg tat gat gga agt aat aca tac tat gca gac tcc gtg aag ggc

Fw3 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat ctg caa ata aag agc ctg aga gcc
gag gac acg gct gtc tat tac tgt

CDR3 gcg aga ggc cgt gga tat agt gcc caa ggg aat cgg aat agg gct tac tac ttt gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGKV3-15*01 F
IGKJ2*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 EIVMTQSPATLSVSPGERVILSC
CDR1 RASQSVSSNLA
Fw2 WYQQKPGQPRLLIY
CDR2 GAFTRVT
Fw3 GVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
CDR3 QQYNDRPPYT
Fw4 FGQGTKLEIK

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gaa ata gtg atg acg cag tct cca gcc acc ctg tct gtg tct cca ggg gaa agg gtc atc ctc tcc
tgc

CDR1 agg gcc agt cag agt gtt agc agc aac tta gcc

Fw2 tgg tac cag cag aaa cct ggc cag cct ccc agg ctc ctc atc tat

CDR2 ggt gca ttc acg agg gtc act

Fw3 ggt gtc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg
cag tct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt

CDR3 cag cag tac aat gac cgg ccc ccg tac act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa

AT14-013 (2K23-1K13)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV4-4*02 F
IGHD6-19*01 F
IGHJ5*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QGRLQESGPGLVKPSSETLTLTCAVSGGSSVS
CDR1 SPNWWT
Fw2 WVRQAPGKGLEWIG
CDR2 EIYYGGRVSYNSALRS
Fw3 RVTISSDRSKEEFSLKLRVTAADTAIYYC
CDR3 AGQKNIGCGYSSCFISWFDT
Fw4 WGQGIAVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag ggg cga ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg acc ctc acg tgc
gct gtg tcc ggt ggc tcc tcc gtc agc

CDR1 agt cct aac tgg tgg act

Fw2 tgg gtc cgc cag gcc ccc ggg aag ggg ctg gag tgg att gga

CDR2 gaa atc tat tat ggt ggg aga gtg agc tac aac tcg gcc ctc agg agt

Fw3 cga gtc acc att tca tca gac agg tcc aaa gag gag ttc tcc ctg aaa ctg agg tct gtg acc gcc
gcg gac acg gcc ata tat tat tgt

CDR3 gcg ggt caa aaa aat att ggc tgt ggt tac agc agt tgc ttt atc agt tgg ttc gac acc

Fw4 tgg gga cag gga att gcg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGKV4-1*01 F
IGKJ2*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 DIVMTQSPDSLAVSLGERATIAC
CDR1 KSSQTILQRSNHLNYLA
Fw2 WYQQKPGQPPKVLIIY
CDR2 WASTRES
Fw3 GVPDRFSGSGSDFTLTINSLQAEDVAVYYC
CDR3 HQYYTTPQT
Fw4 FGQGTKVEIK

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc gcc
tgc

CDR1 aag tcc agc cag act att tta caa agg tcc aac cat ttg aac tac tta gct

Fw2 tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aaa gtg ctc att tat

CDR2 tgg gca tct acc cgg gaa tcc

Fw3 ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc aac agc ctg
cag gct gag gat gtg gca gtt tat tac tgt

CDR3 cac caa tat tat act act ccg cag act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag gtg gag atc aaa

AT14-014 (6P13-5H5)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-15*01 F
IGHD3-22*01 F
IGHJ4*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
CDR1 DAWMS
Fw2 WVRQAPGKGLEWVG
CDR2 HINTKVDGGTTEYAAPVKG
Fw3 RFTISRDDSKNSLYLHMDSLKTEDTAVYYC
CDR3 TTEAIYDSSGYFHDY
Fw4 WGQGS�VTSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggt ttg gta aag cct ggg ggg tcc ctt aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc act ttc agt

CDR1 gac gcc tgg atg agc

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt ggc

CDR2 cat att aac acc aaa gtt gat ggt ggg aca aca gag tac gct gca ccc gtg aaa ggc

Fw3 aga ttc acc atc tca aga gat gat tca aaa aat tcg ctg tat ctg cac atg gac agc ctg aaa acc
gag gac aca gcc gtg tat tac tgt

CDR3 acc aca gag gcg ata tat gat agt agt ggt tat ttc cat gac tat

Fw4 tgg ggc cag gga tcc ctg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGKV4-1*01 F
IGKJ1*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINC
CDR1 KSSRSVLYSSNNKNYLA
Fw2 WYQQKPGQPPKLLIY
CDR2 WASIRES
Fw3 GVPDRFSGSGSTDFLTINSLQAEDVAVYYC
CDR3 QQYSRPPT
Fw4 FGQGTKVEIK

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac
tgc

CDR1 aag tcc agc cgg agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct

Fw2 tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac

CDR2 tgg gca tct atc cgg gaa tcc

Fw3 ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc aac agc ctg
cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt

CDR3 cag caa tat tct cgt cct cgg acg

Fw4 ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa

AT14-015 (1L18-7H16)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-49*04 F
IGHD4-11*01 F
IGHJ6*03 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 EVQLVESGGGLAQPGRSLRLSCTASGFRFG
CDR1 DFAMS
Fw2 WVRQAPGKGLEWVG
CDR2 FIRTKANDGTTEYAASVKG
Fw3 RFIISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYC
CDR3 ASDPFMTTDYYYYYMDV
Fw4 WGKGTTVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gag gtg cag ctg gtg gag tcg ggg gga ggc ttg gca cag cca ggg cgg tcc ctg aga ctc tcc tgt
aca gct tct gga ttc agg ttt ggt

CDR1 gat ttt gct atg agt

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag gga ctg gag tgg gta ggt

CDR2 ttc att aga acc aaa gct aat gat ggg aca aca gaa tac gcc gcg tct gtg aaa ggc

Fw3 aga ttc atc atc tca aga gat gat tcc aaa agt atc gcc tat ctg caa atg aac agc ctg aaa acc
gag gac aca gcc gtt tat tac tgt

CDR3 gct agc gat ccc ttc atg act aca gac tat tac tac tac tac atg gac gtc

Fw4 tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGLV2-8*01 F
IGLJ2*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 QSALTQPPSASGSPGQSVTIISC
CDR1 TGTSSDVGGYNSVS
Fw2 WYQHHPGKAPKLMIIY
CDR2 EVYKRPL
Fw3 GVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDAAYYYC
CDR3 SSYGTVLFL
Fw4 GGGTKLTVL

NUCLEÓTIDO:

Fw1 cag tct gcc ctg act cag cct ccc tcc gcg tcc ggg tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc

CDR1 act ggg acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tct gtc tcc

Fw2 tgg tac caa cat cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat

CDR2 gag gtc tat aag cgg ccc tta

Fw3 ggg gtc cct gat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc gtc tct ggg ctc
cag gct gag gat gag gct tat tat tac tgc

CDR3 agc tca tat gga ggc acc gtg cta ttc

Fw4 ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

AT14-016 (1P22-8F16)

Cadena pesada

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGHV3-23*01 F
IGHD2-15*01 F
IGHJ3*02 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 EVQVLESGGDSVQPGGSLRLSCAASGFTFS
CDR1 SYAMT
Fw2 WVRQAPGKGLKWVS
CDR2 SISGGGSTYYADSVRG
Fw3 RFTISRDNKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYC
CDR3 AKGYVGCSSGNCYSGGAFDI
Fw4 WGQGTVVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gag gtg caa gtg ttg gag tct ggg gga gac tgg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt
gca gcc tct gga ttc acc ttt agc

CDR1 agc tat gcc atg acc

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg aaa tgg gtc tca

CDR2 agt att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg agg ggc

Fw3 cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat gtg cag atg aac agc ctg aga gcc
gag gac acg gcc gta tat tac tgt

CDR3 gcg aaa gga tat gtg ggg tgt agt ggt ggg aac tgc tac tgg ggg ggt gct ttt gat atc

Fw4 tgg ggc caa ggg aca gtg gtc acc gtc tct tca

Cadena ligera

Recombinada a partir de los segmentos génicos:

IGLV3-21*01 F
IGLJ2*01 F

AMINOÁCIDO:

Fw1 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC
CDR1 GGNNIGSESVH
Fw2 WYQQKPGQAPVVVIY
CDR2 YDTRPS
Fw3 GIPERFSGSNGNTATLTISRVEAGDEADYYC
CDR3 QVWDNTSDHPVVF
Fw4 GGGTKLTVL

NUCLEÓTIDO:

Fw1 tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tca gtg tca gtg gcc cca gga aag acg gcc cgg att acc tgt

CDR1 ggg ggg aac aac att gga agt gaa agt gtt cac

Fw2 tgg tac cag cag aag cca ggc cag gcc cct gtg gtg gtc atc tat

CDR2 tat gat acc gac cgg ccc tca

Fw3 ggg atc cct gag cgc ttc tct ggc tcc aac tct ggg aac acg gcc acc ctg acc atc agc agg gtc
gaa gcc ggg gat gag gcc gac tat tac tgt

CDR3 cag gtg tgg gat aac act agt gat cat cct gtg gta ttc

Fw4 ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta

Historia clínica del donante 59

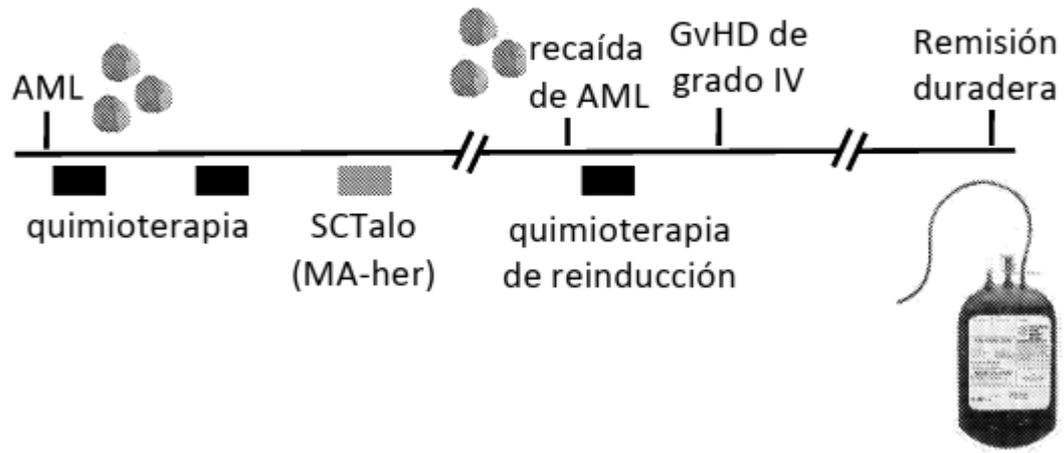
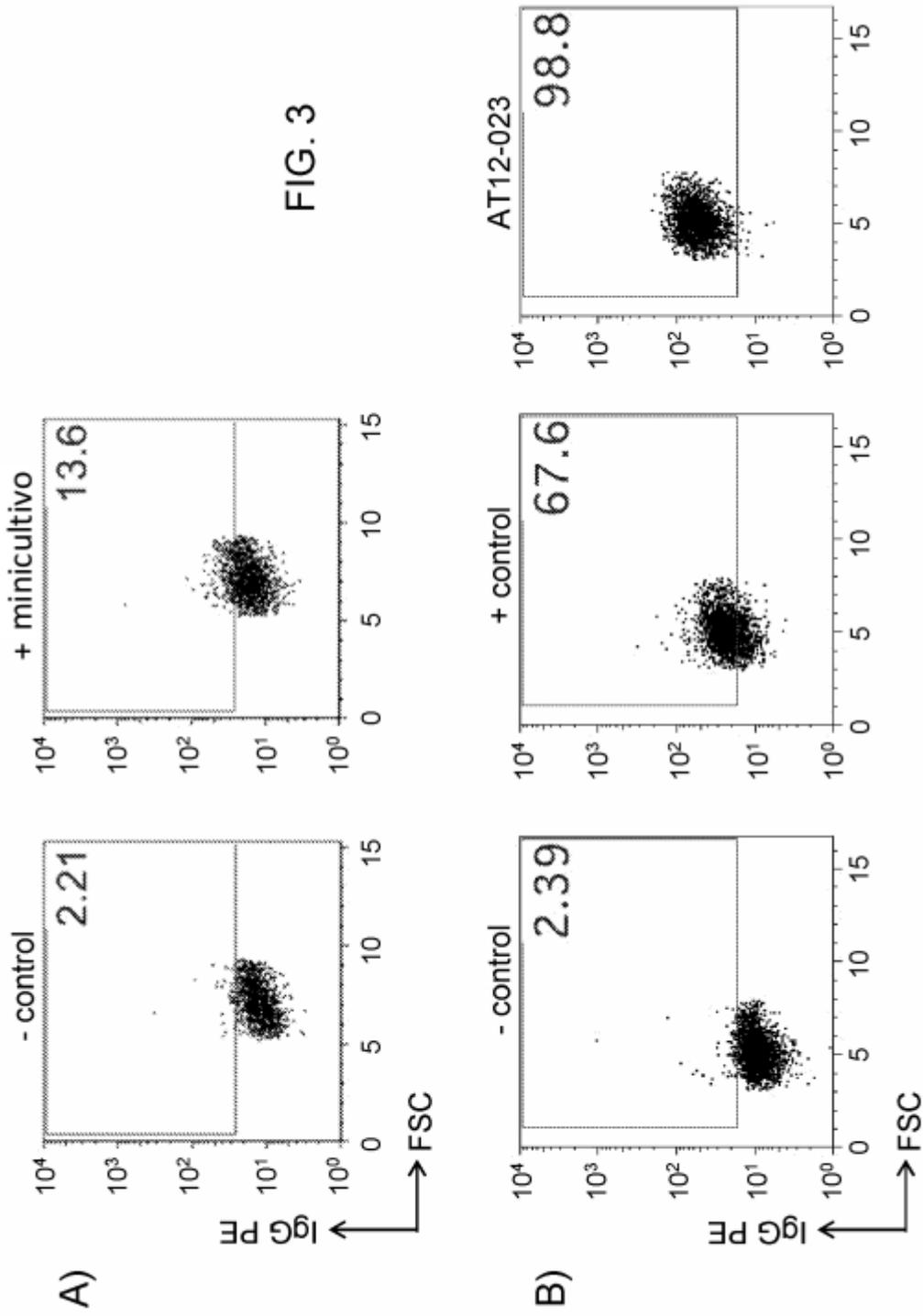


FIG. 2

Unión del sobrenadante del minicultivo a las células de AML



Los anticuerpos no se unen a las líneas celulares irrelevantes

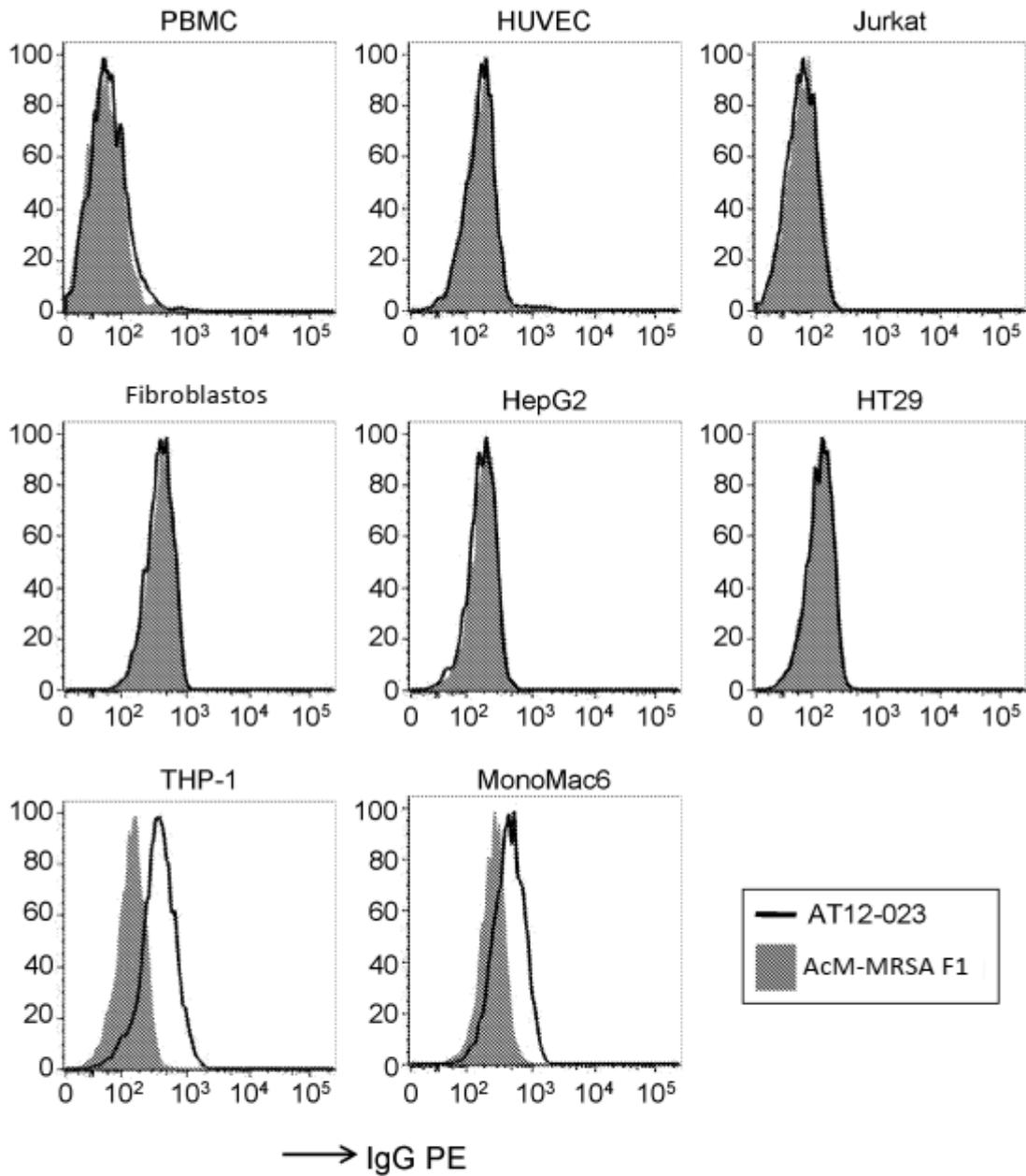


FIG. 4A

Los anticuerpos no se unen a las líneas celulares irrelevantes

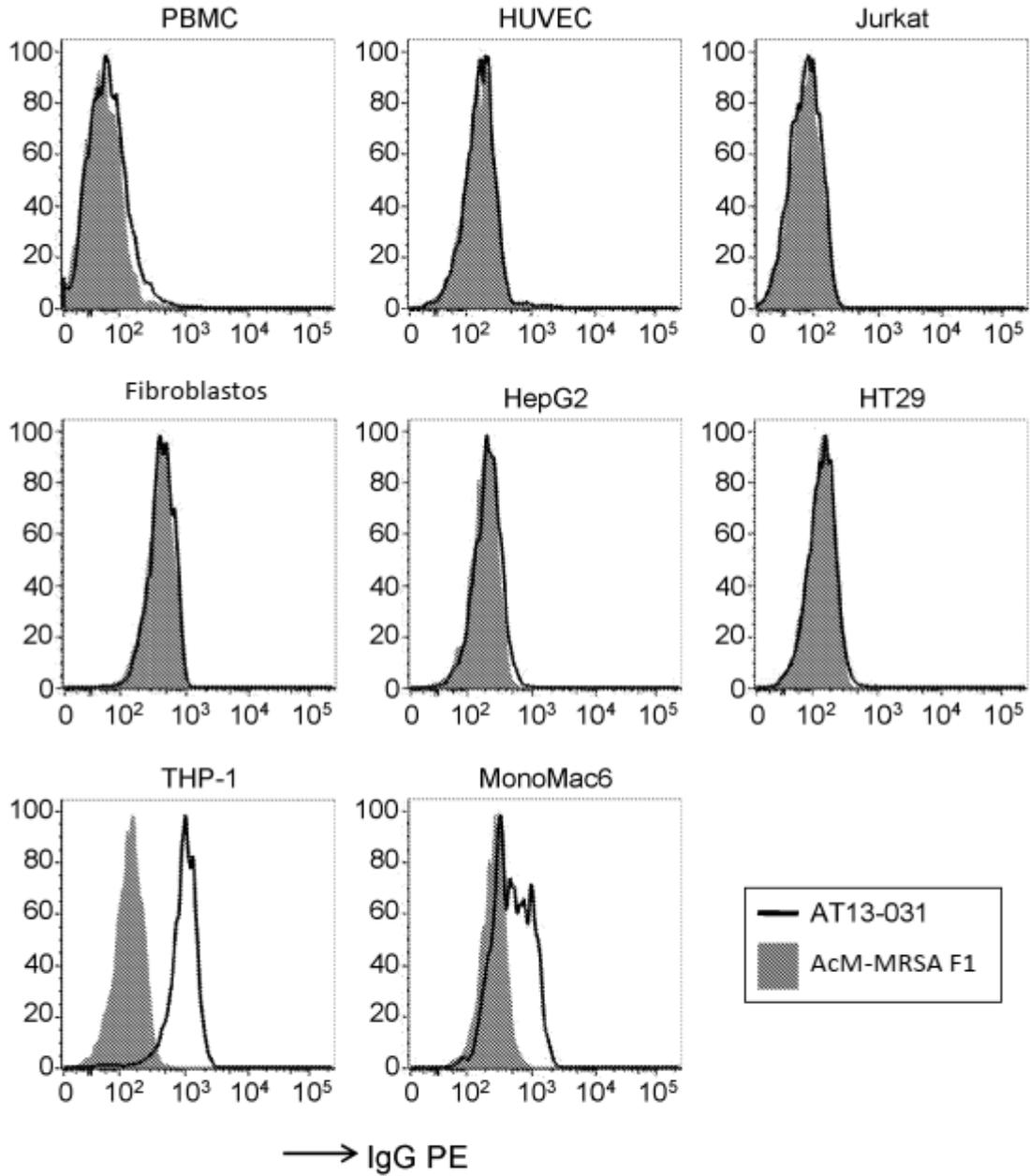


FIG. 4B

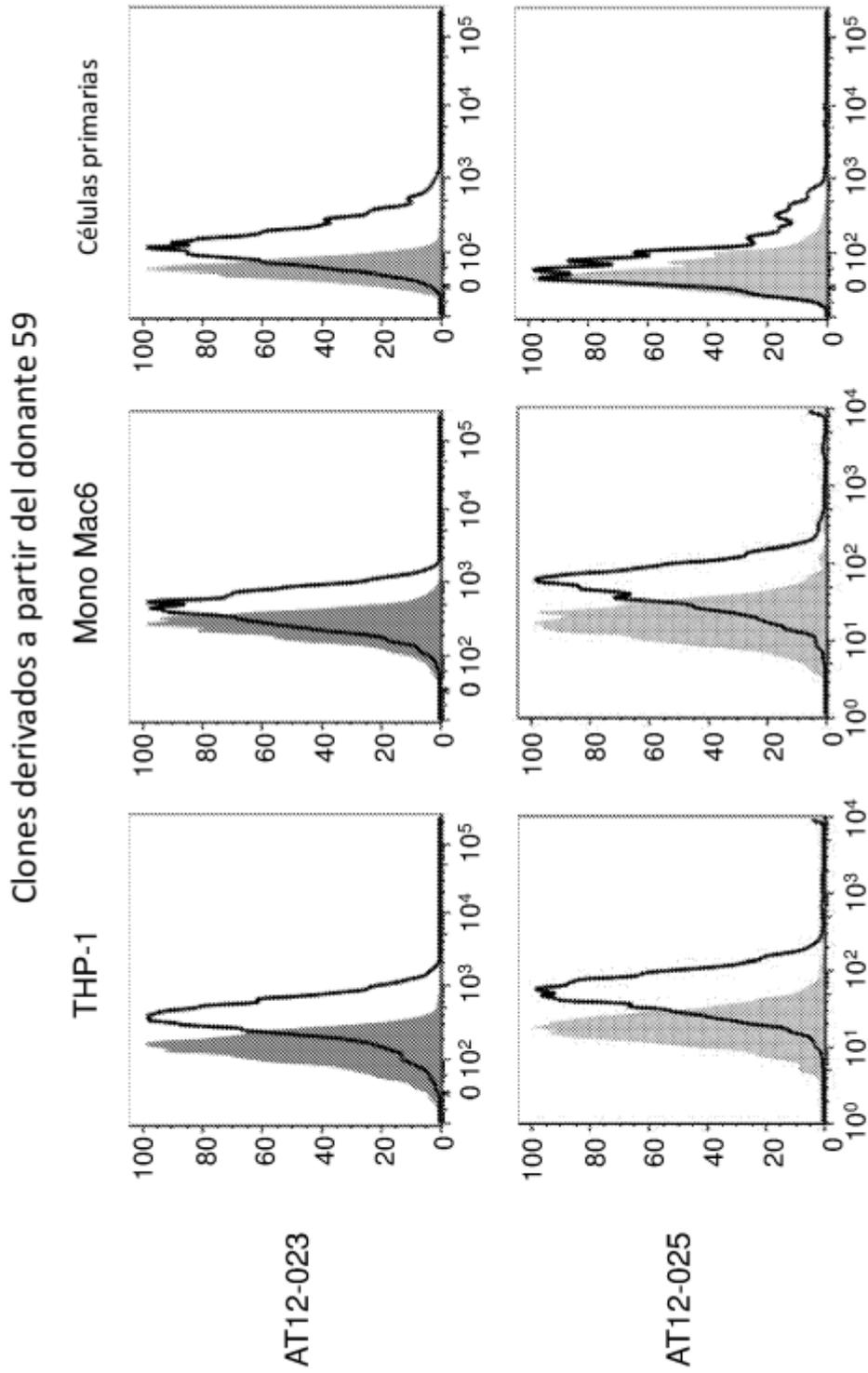


FIG. 5

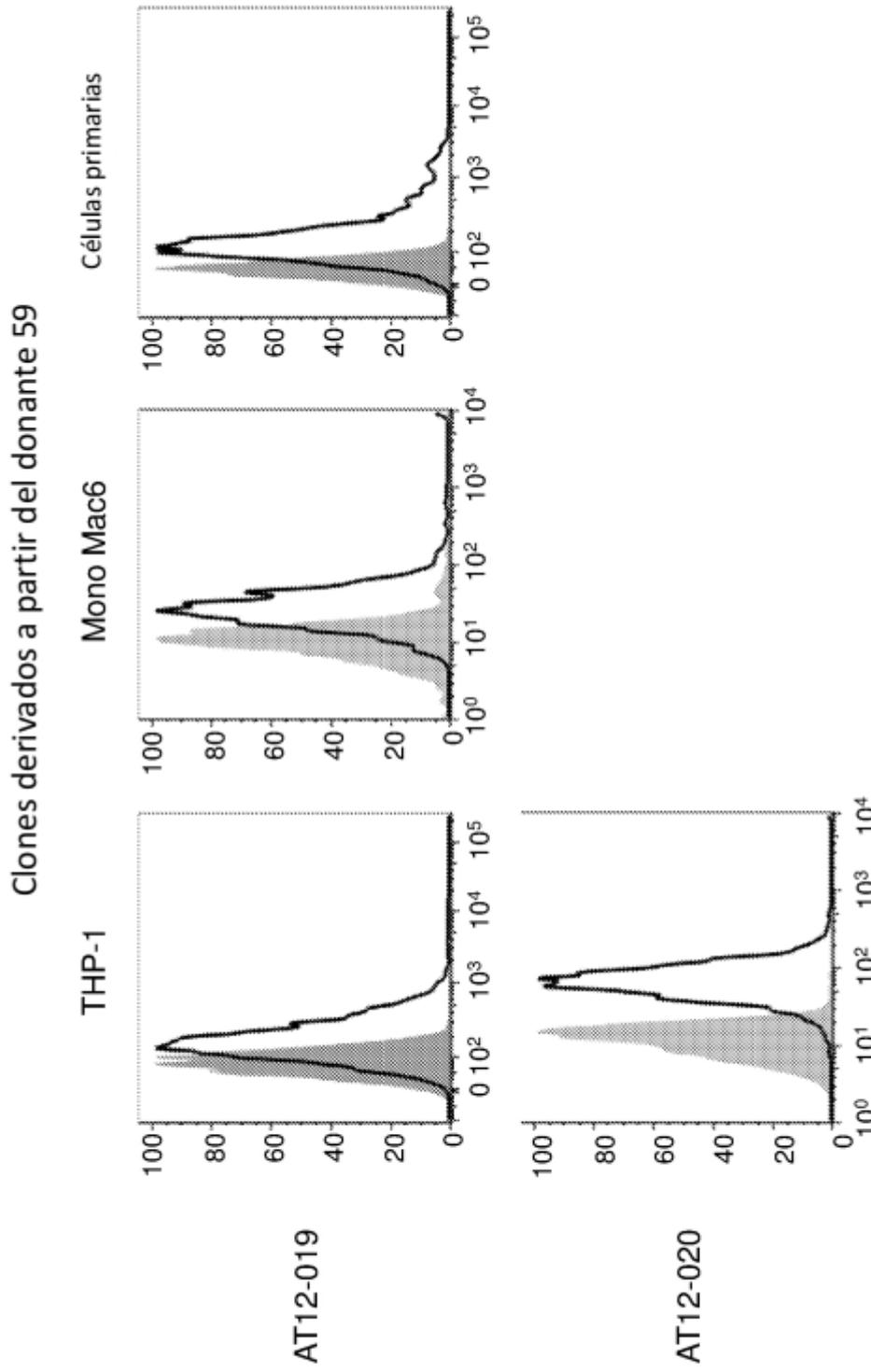


FIG. 5, Continuación

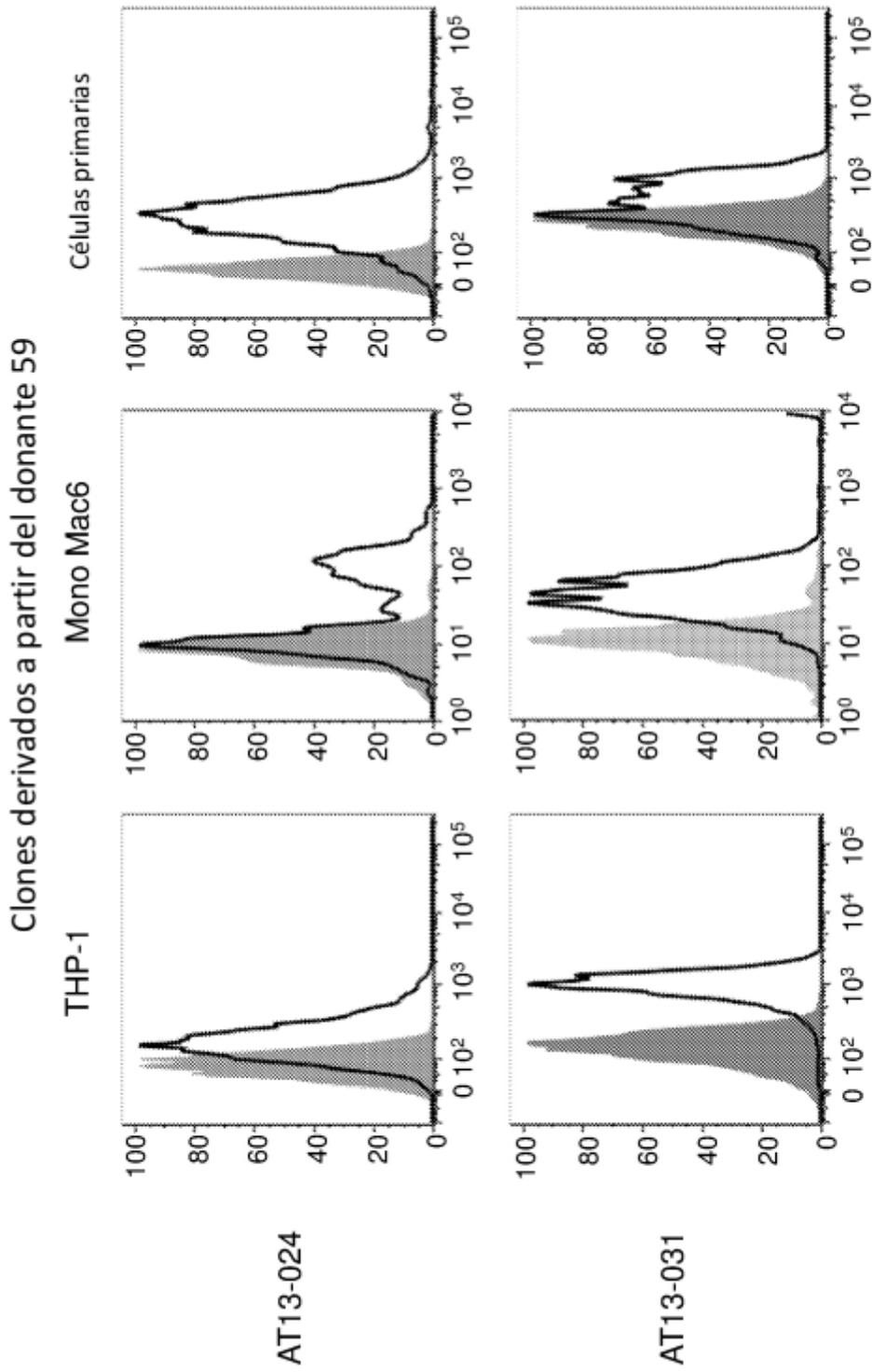


FIG. 5, Continuación

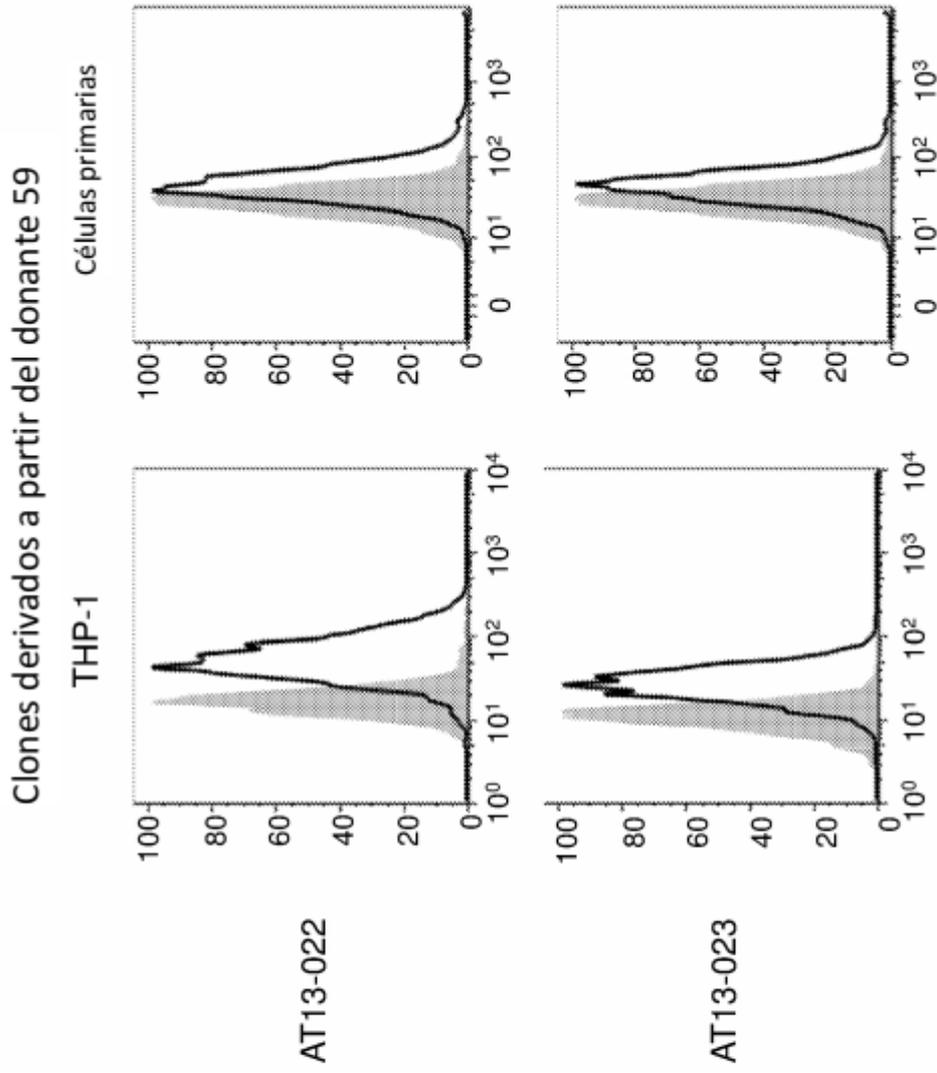


FIG. 5, Continuación

Unión al linfoma no Hodgking - B

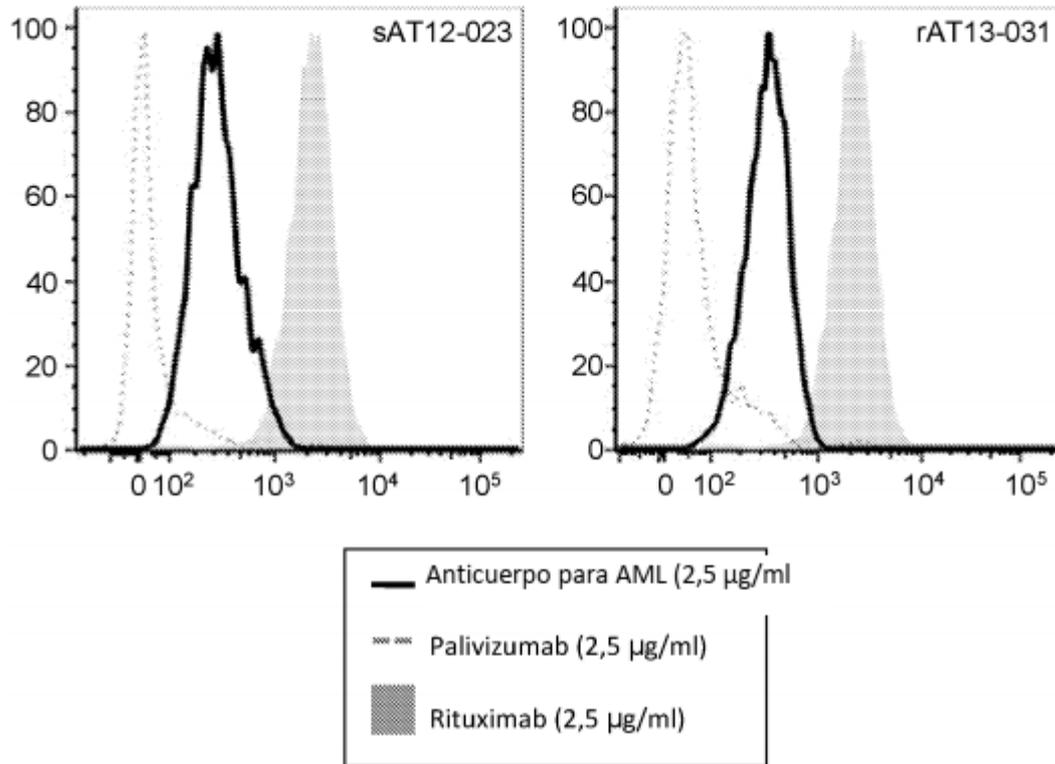


FIG. 6

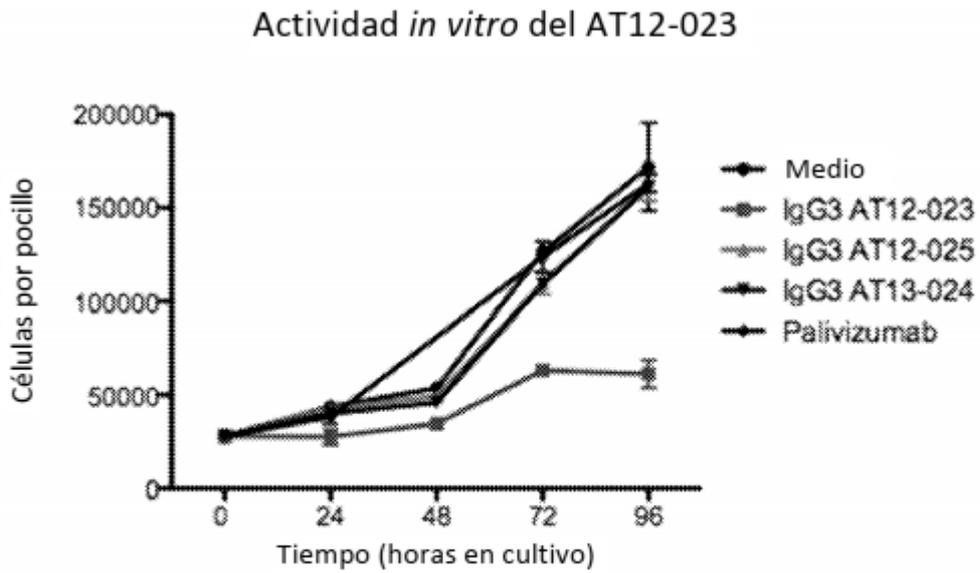


FIG. 7

AT12-023 y AT12-025 reducen la viabilidad de THP-1

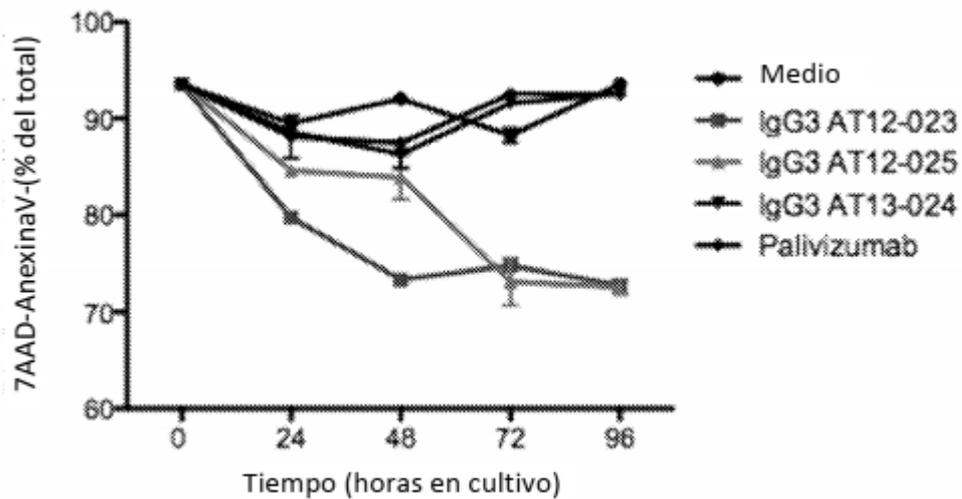


FIG. 8

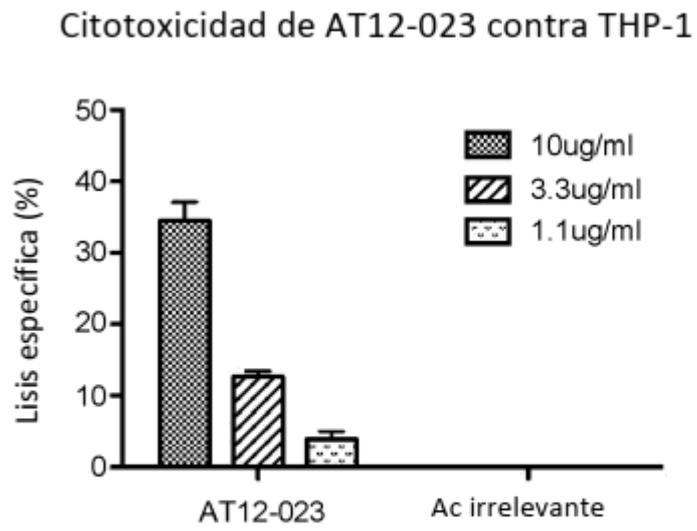


FIG. 9

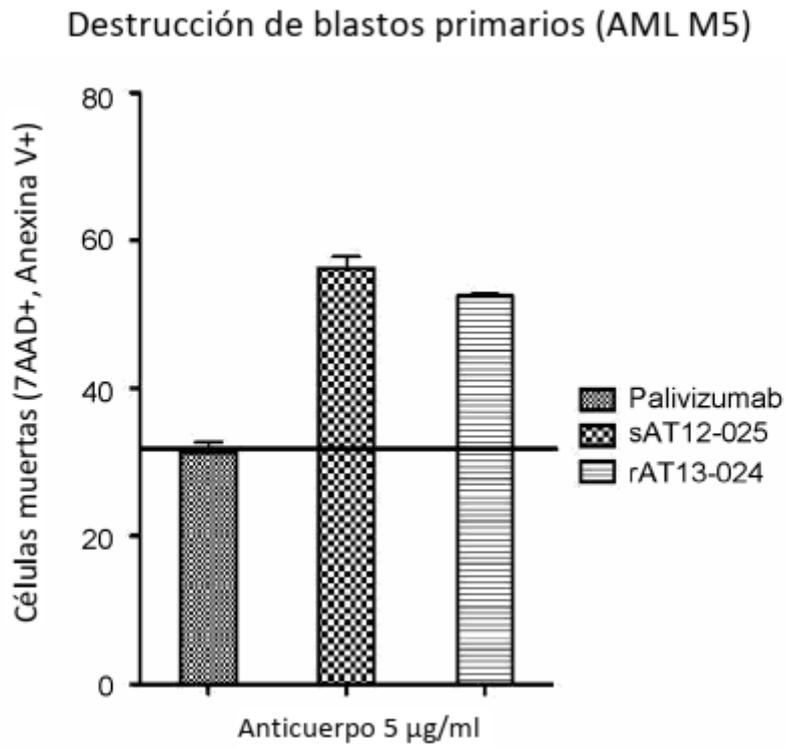


FIG. 10A

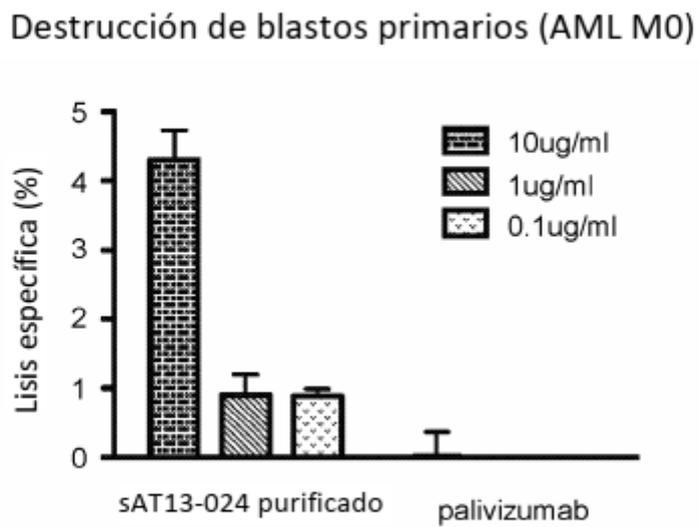


FIG. 10B

Historia clínica del donante 58

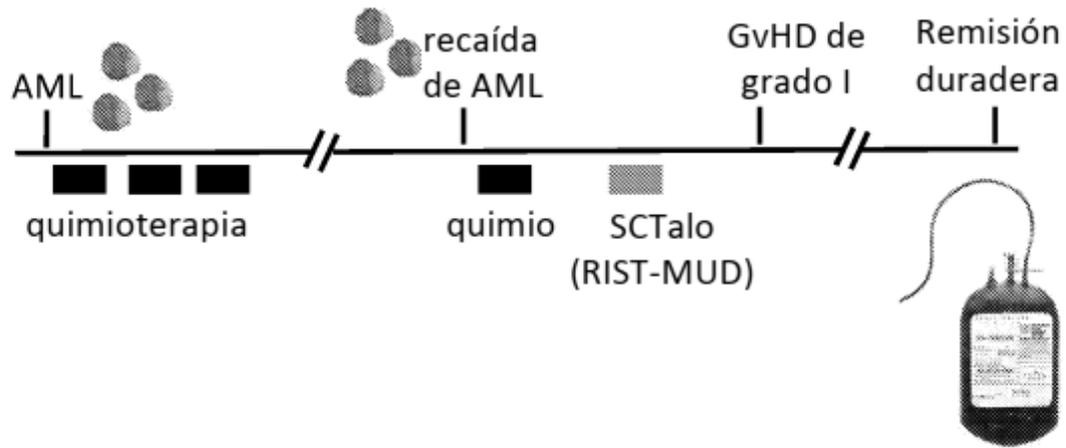


FIG. 11

Anticuerpos derivados a partir del donante 58

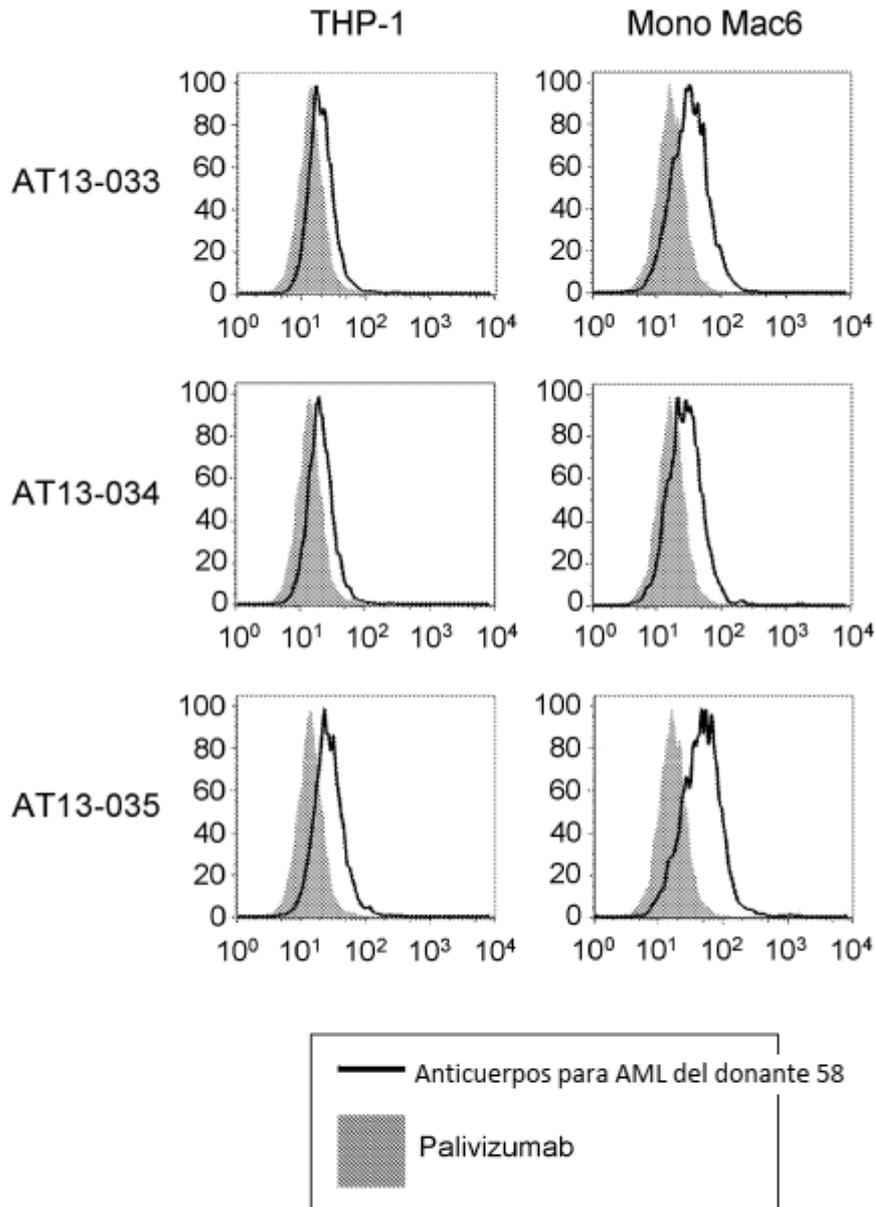


FIG. 12

Anticuerpos derivados a partir del donante 58

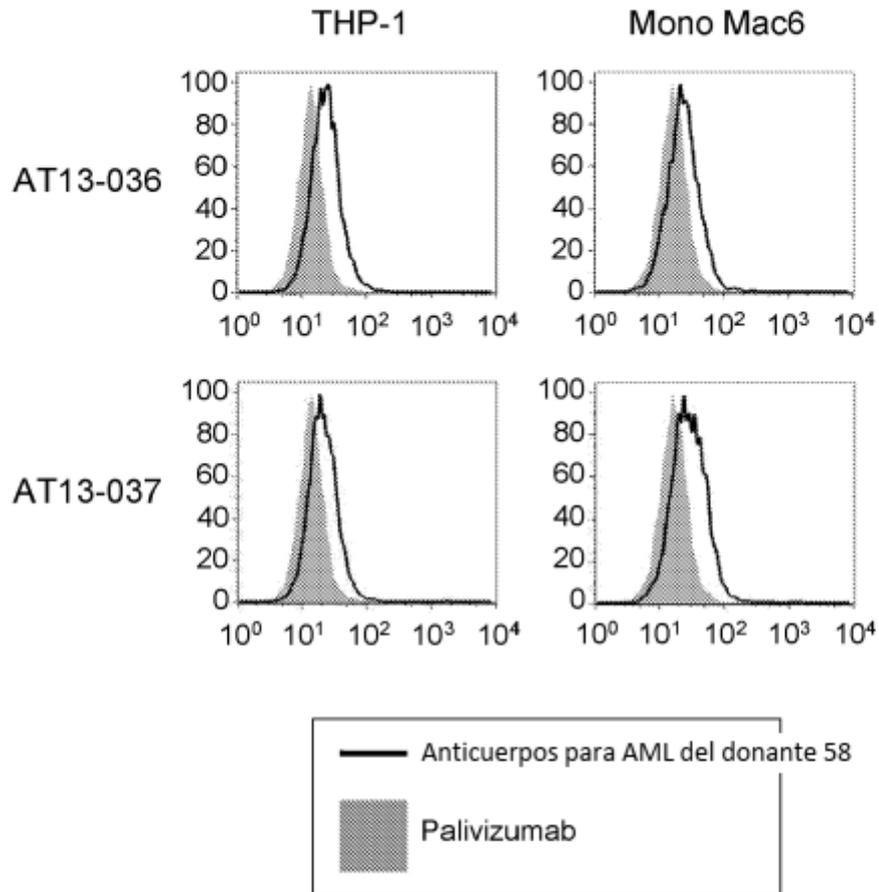


FIG. 12, Continuación

Historia clínica del donante 101

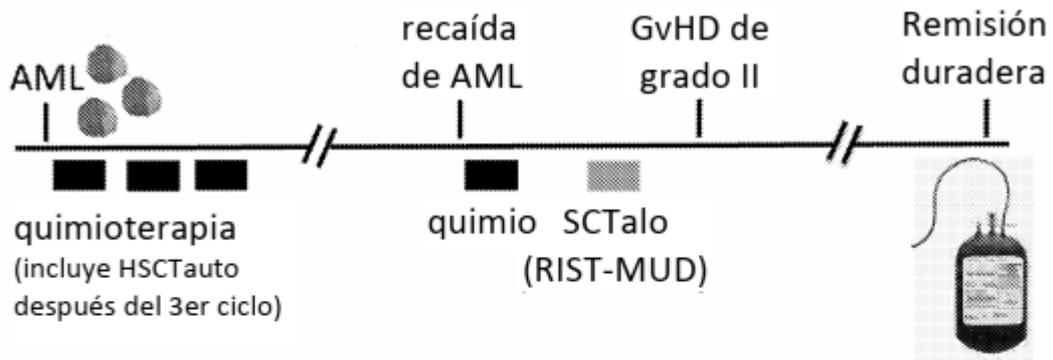


FIG. 13

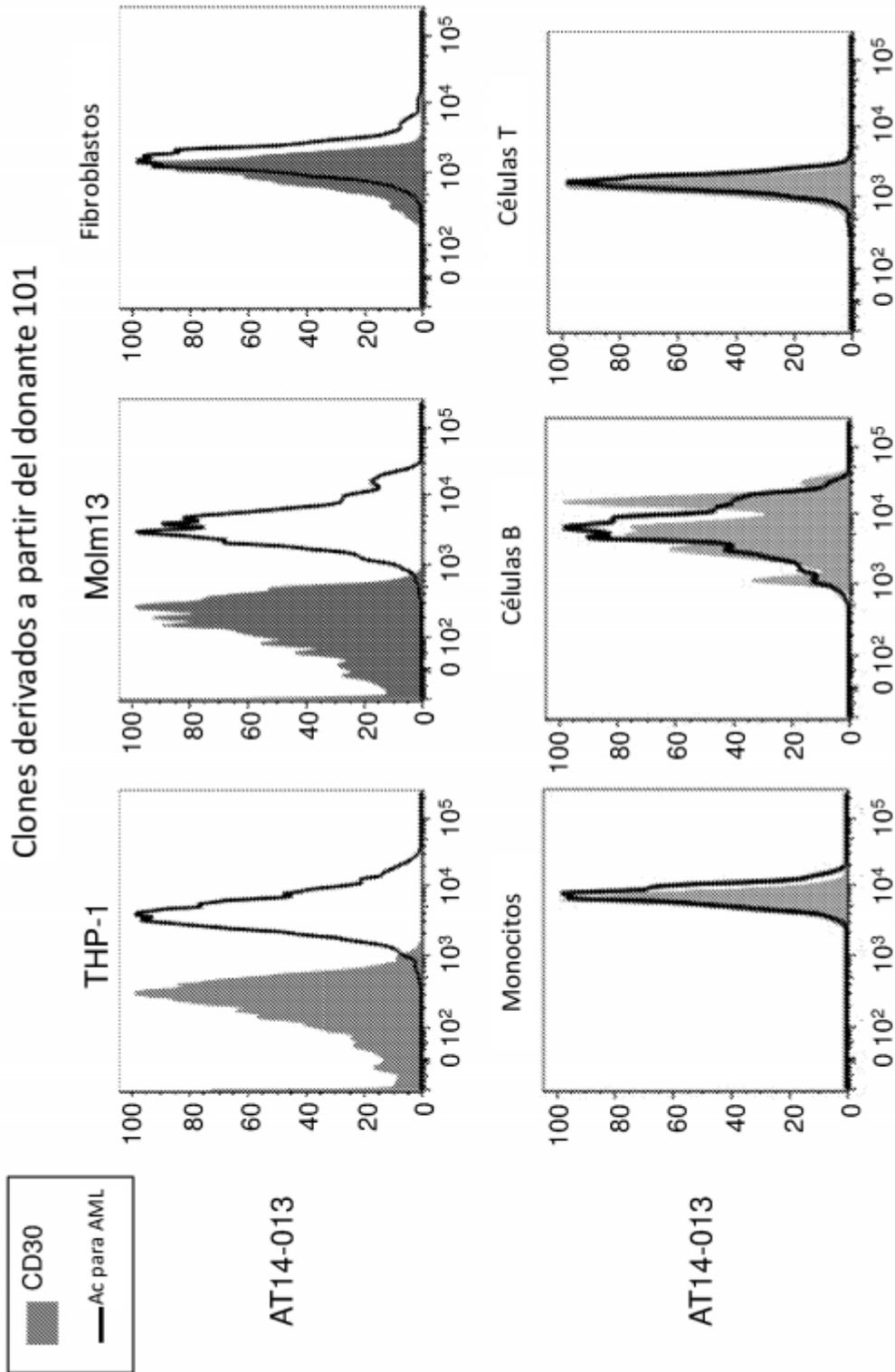


FIG. 14

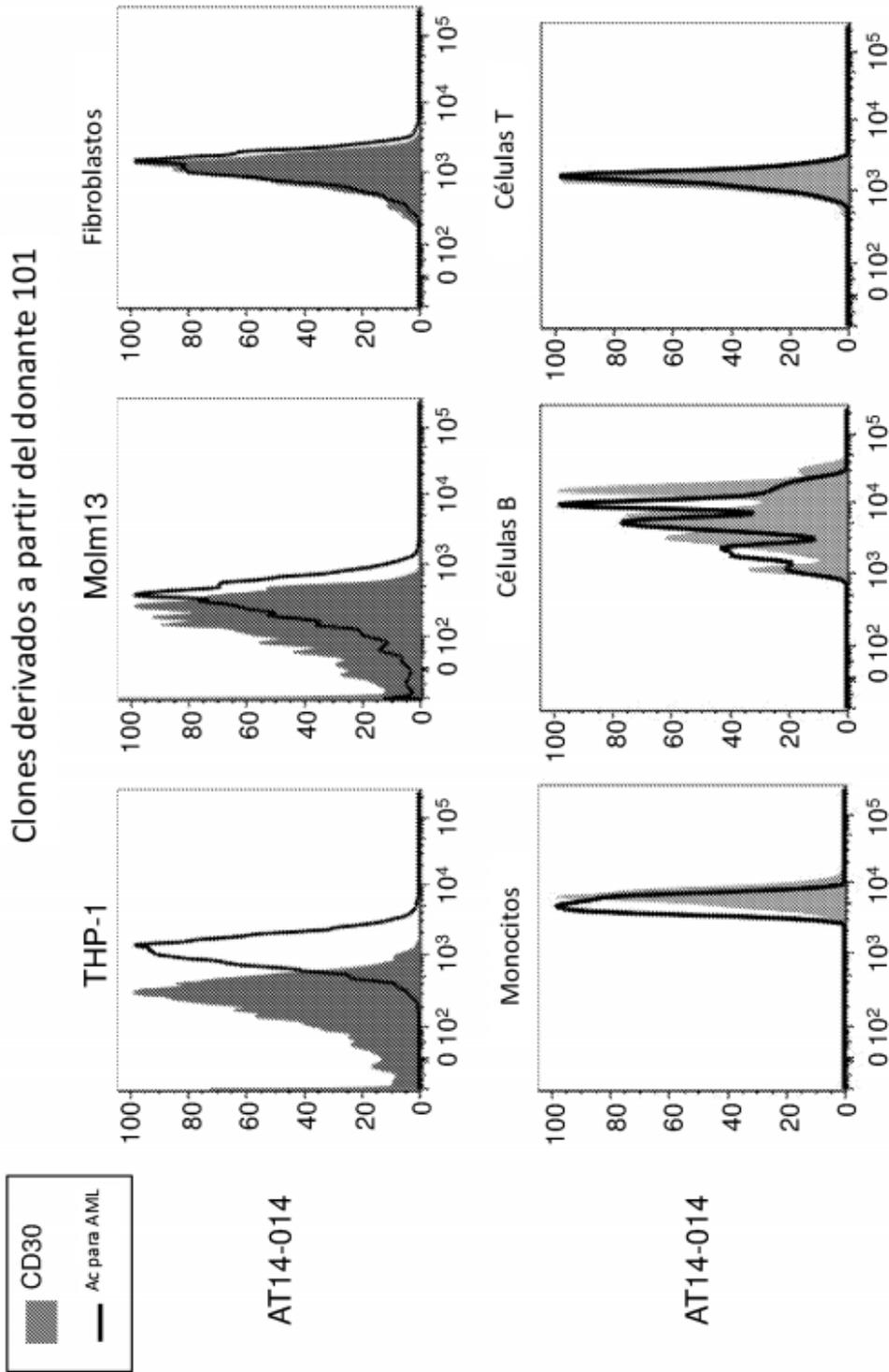


FIG. 14, Continuación

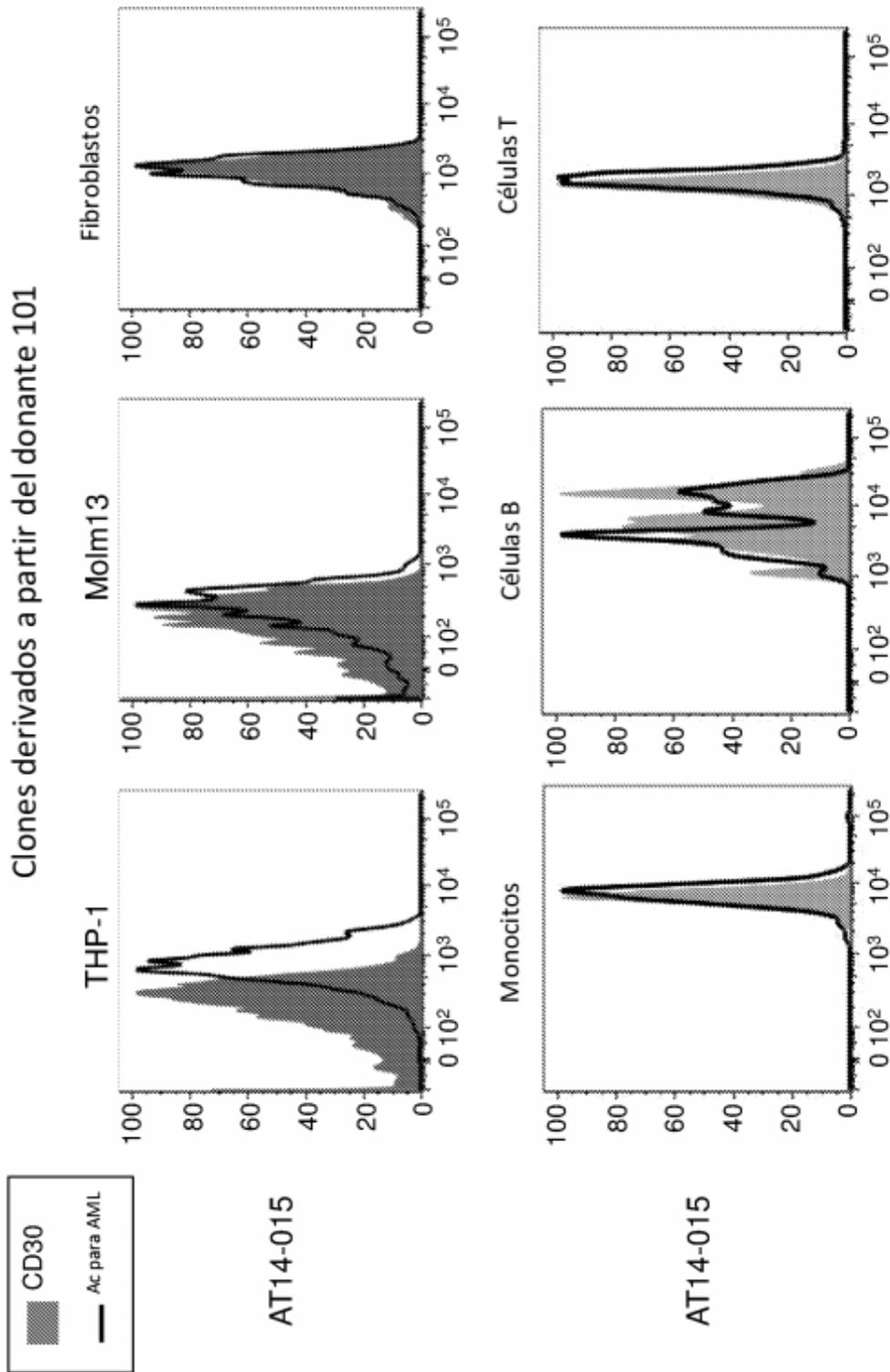


FIG. 14, Continuación

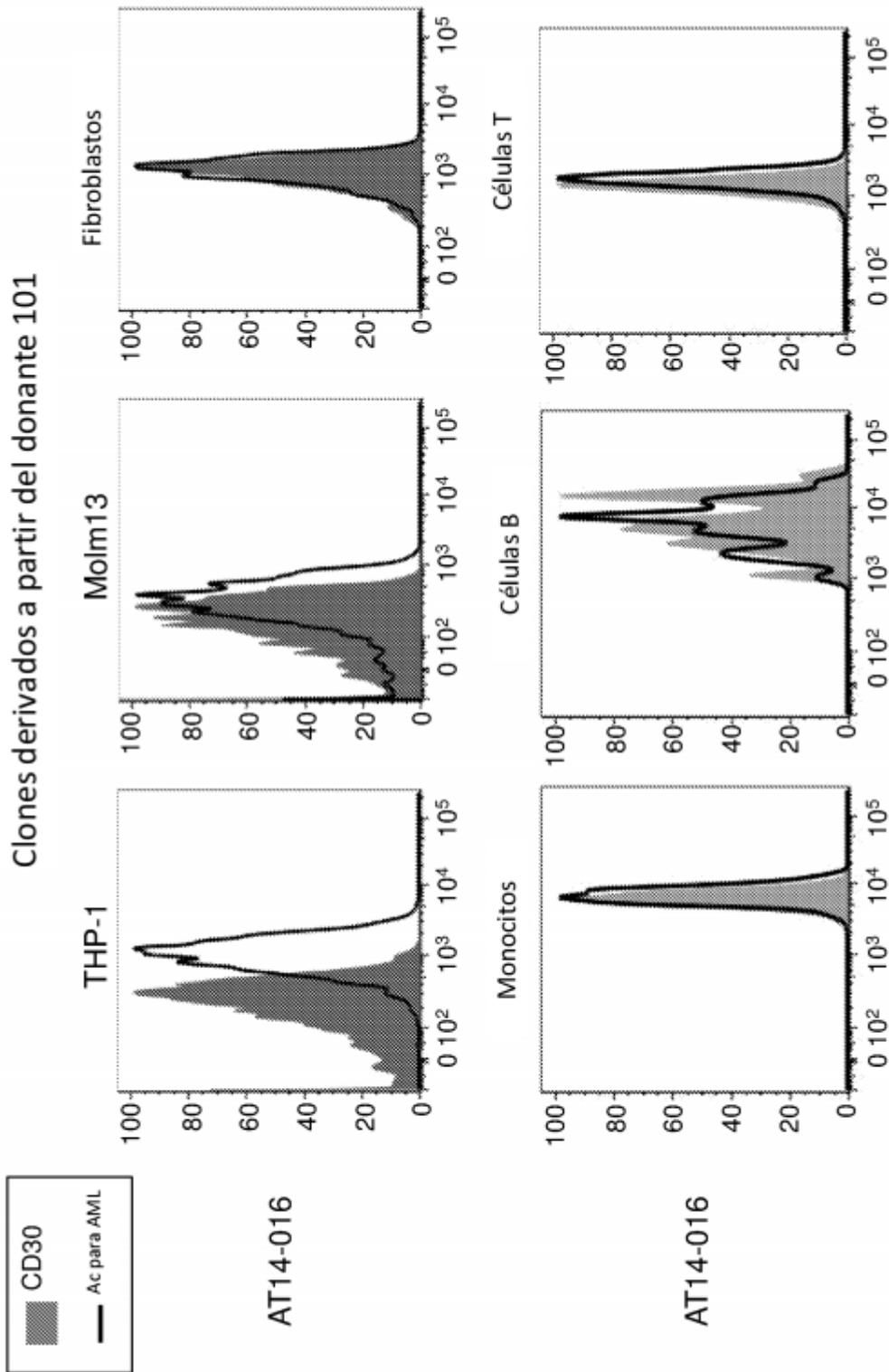


FIG. 14, Continuación

El AT14-013 se une a los blastos primarios de AML

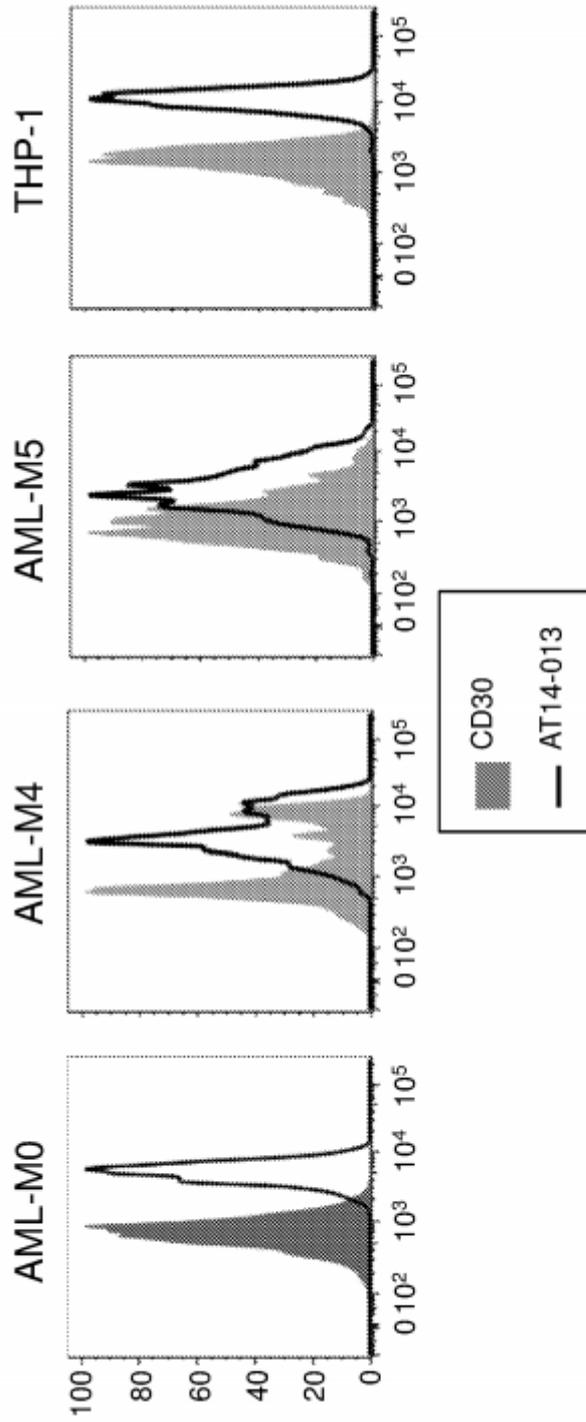


FIG. 15

Destrucción de blastos primarios (AML M5)

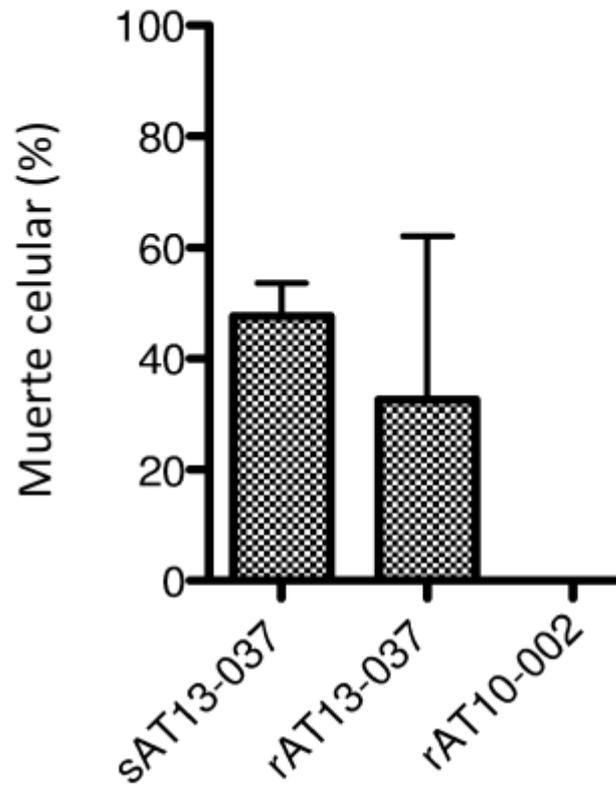
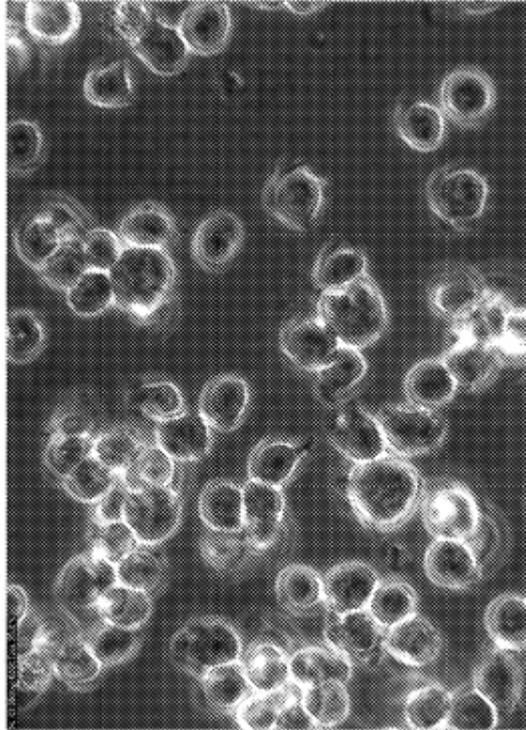


FIG. 16

Los anticuerpos específicos citotóxicos para la AML inducen la muerte de las células THP-1
(obtención de imágenes por contraste de fase)

AT13-023 (no citotóxico)



AT13-037 (citotóxico)

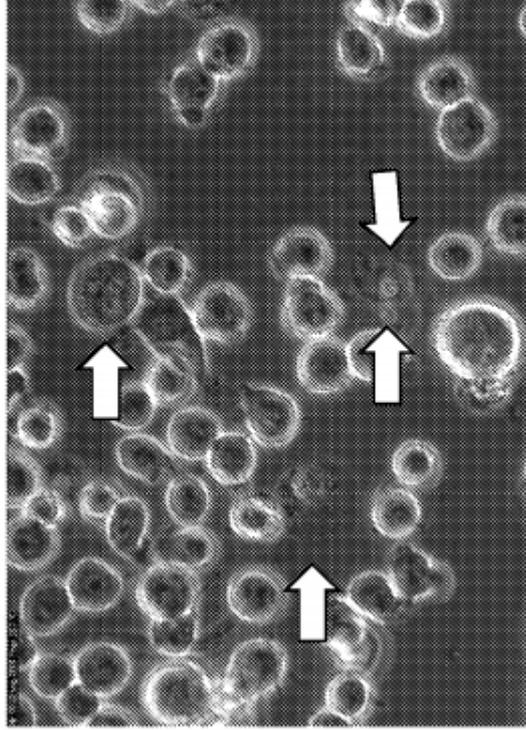


FIG. 17A

Los anticuerpos citotóxicos no inducen apoptosis

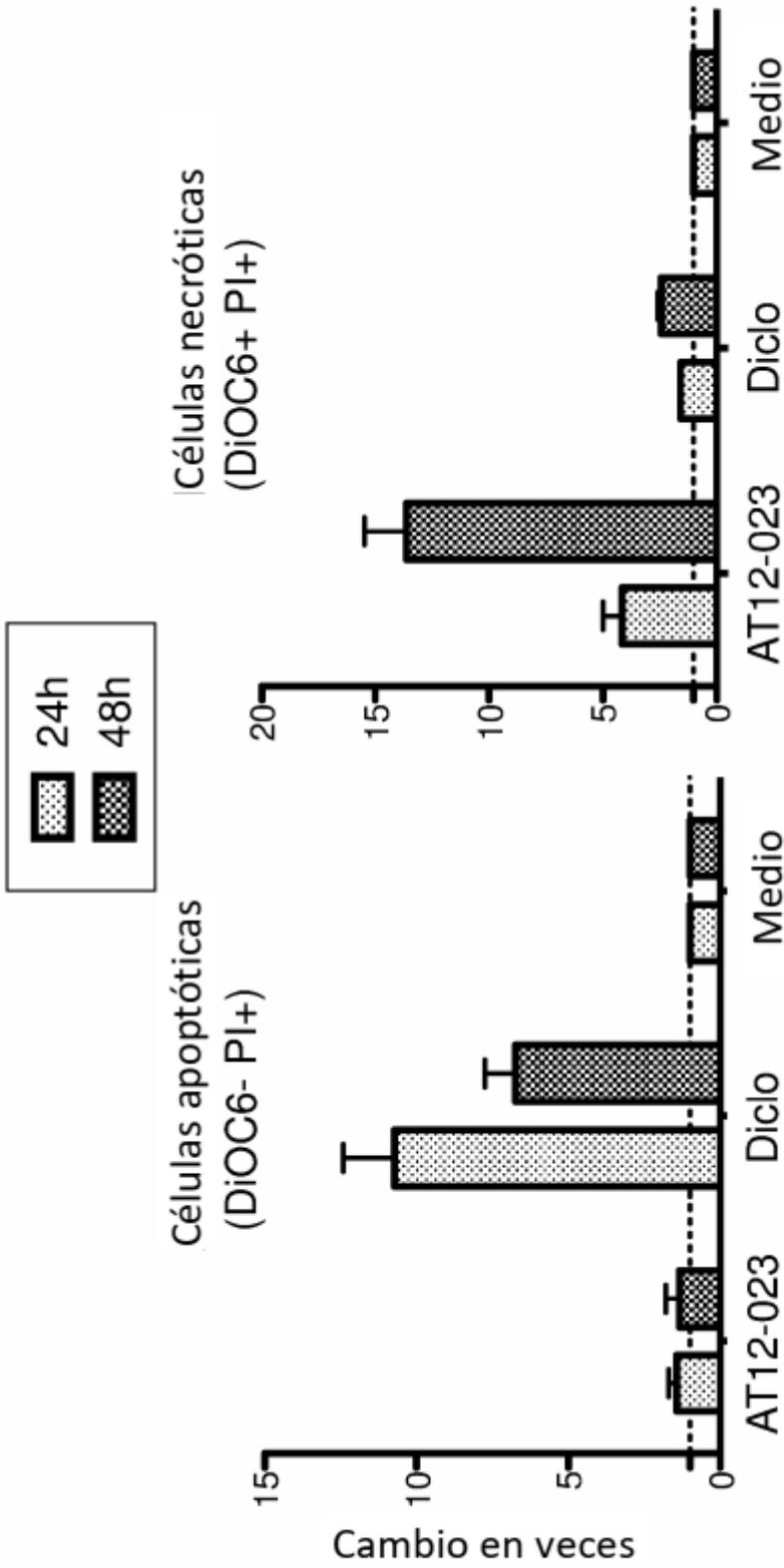
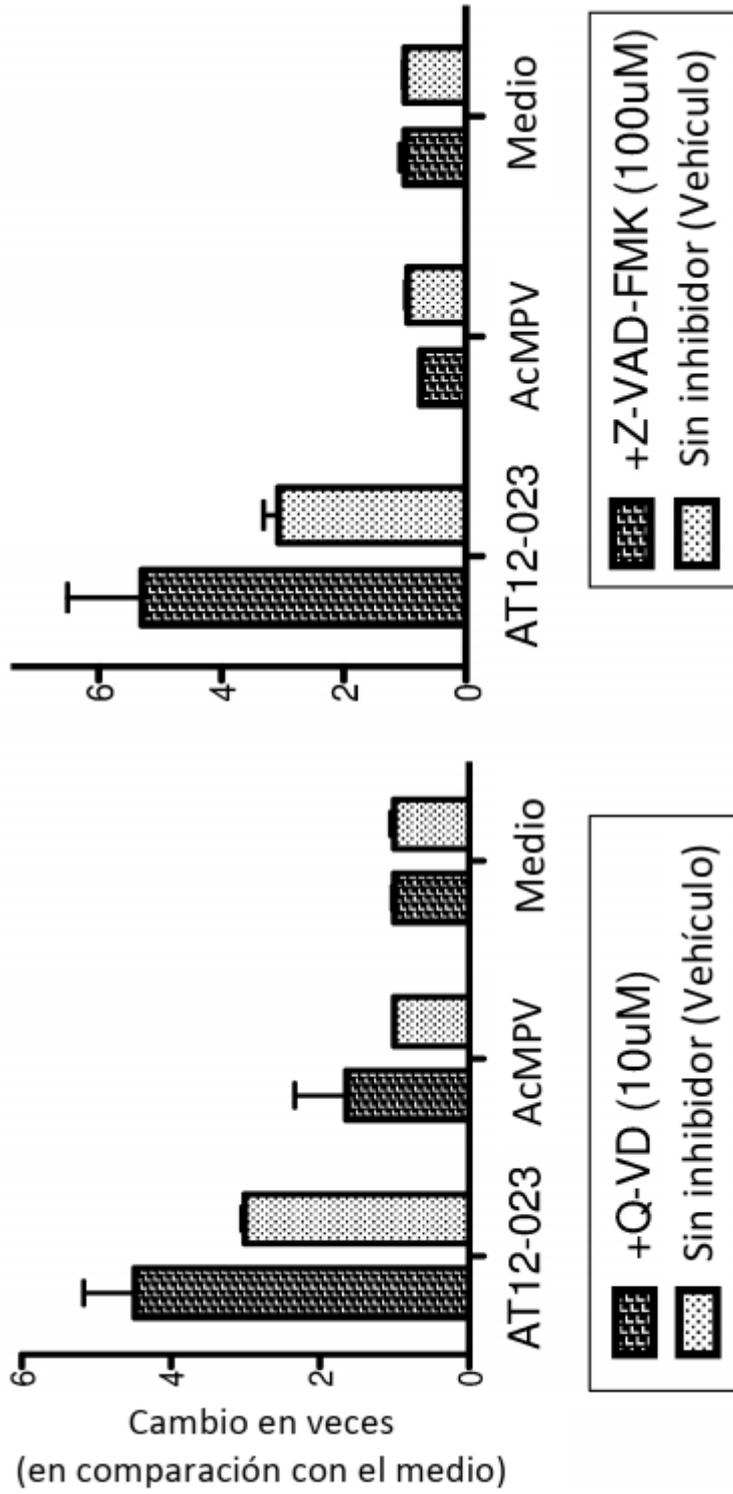


FIG. 17B

La inhibición de las caspasas no bloquea la muerte celular



AcMPV : palivizumab

FIG. 17C

La muerte celular es pasiva: se produce también a 4°C

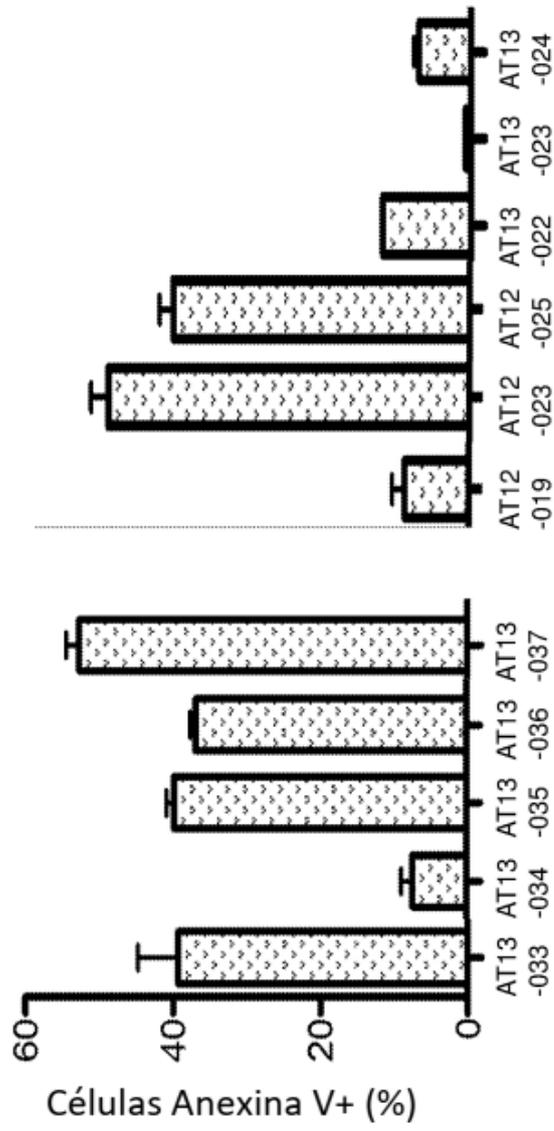


FIG. 18

La citocalasina D no impide la unión de los anticuerpos a la membrana de las células objetivo

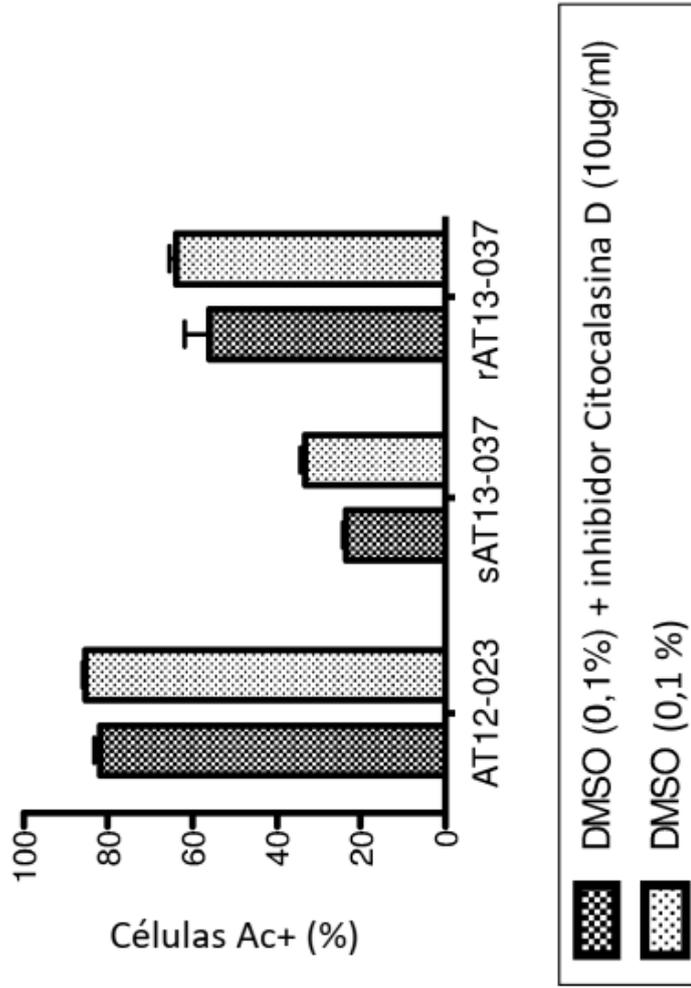


FIG. 19A

La muerte celular se evita mediante la estabilización de la membrana de la célula objetivo

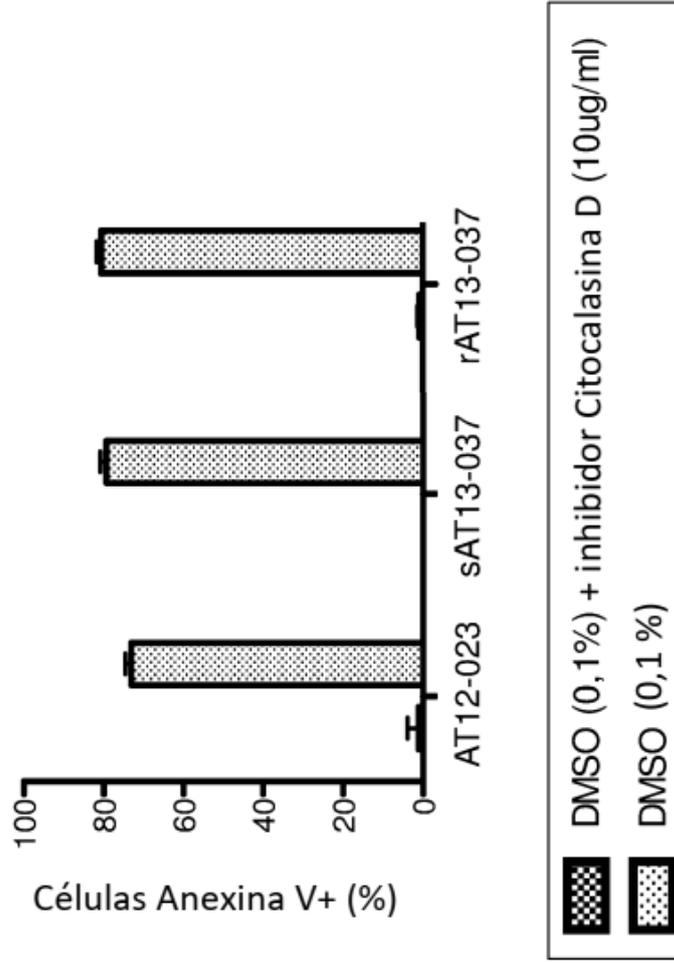


FIG. 19B

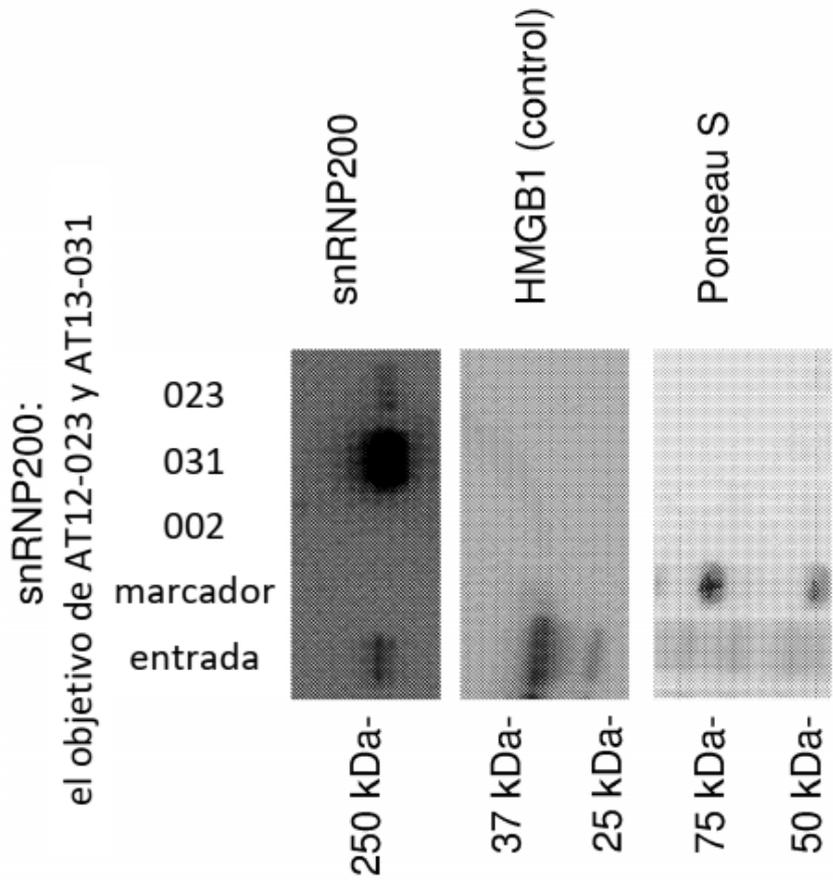
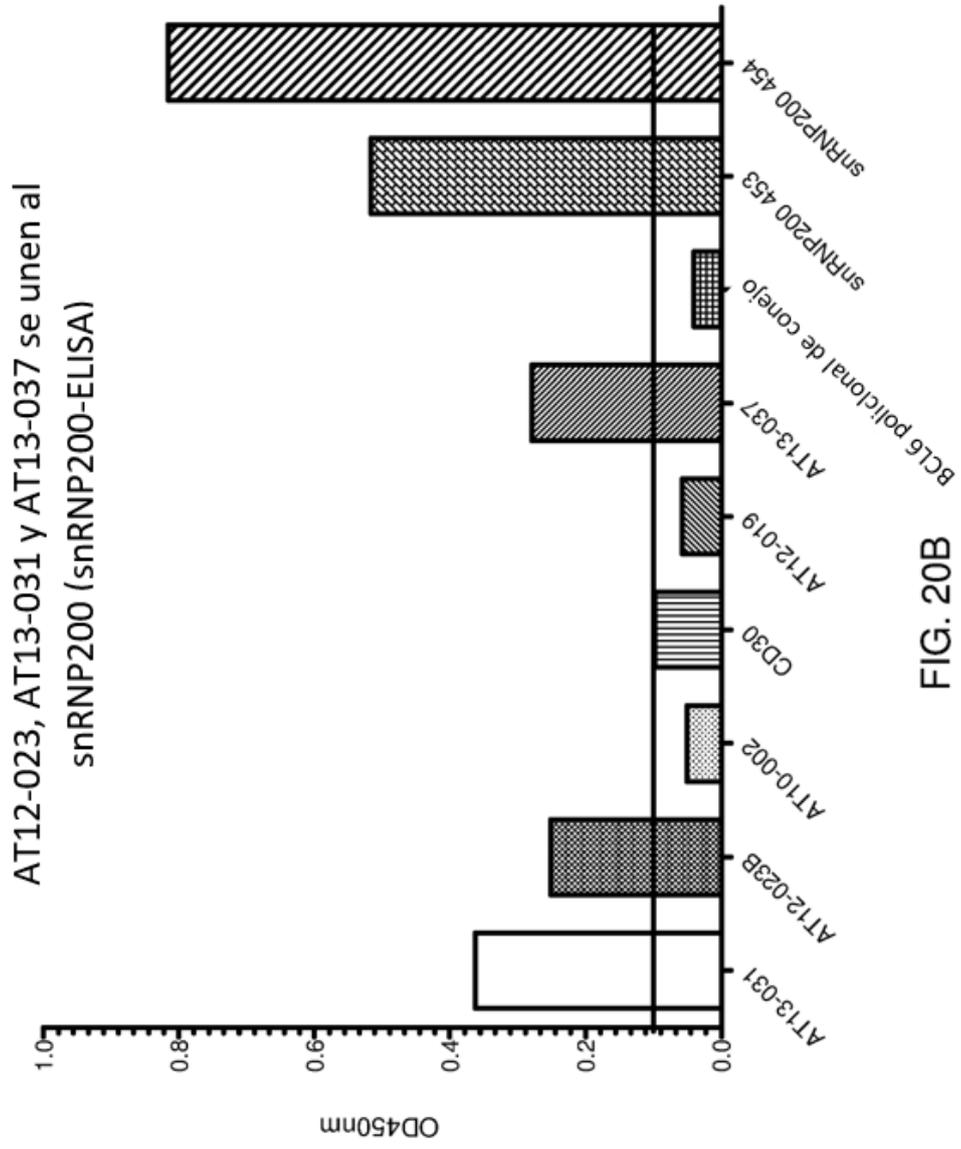


FIG. 20A



El snRNP200 es una proteína nuclear que no se expresa sobre la membrana de células que no son de AML

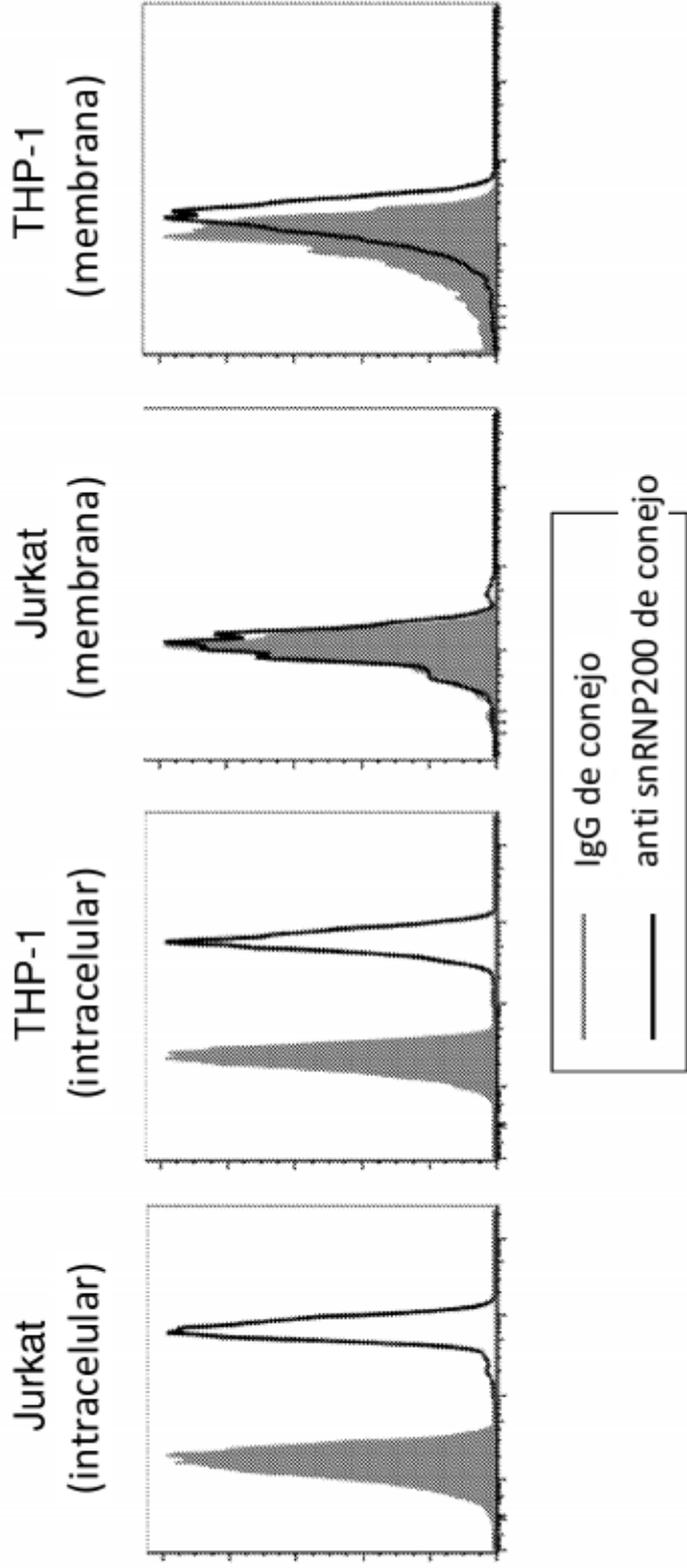


FIG. 21