

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 622**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 16/28</b>	(2006.01) <b>A61P 17/06</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/13</b>	(2006.01) <b>A61P 3/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01) <b>A61P 31/14</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/44</b>	(2006.01)	
<b>A61P 37/08</b>	(2006.01)	
<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)	
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)	
<b>A61P 25/28</b>	(2006.01)	
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)	
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2014 PCT/AU2014/000066**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14117220**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2014 E 14745637 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2951208**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD83 y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**01.02.2013 US 201361759780 P**

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

**25.05.2020**

73 Titular/es:

**KIRA BIOTECH PTY LIMITED (33.3%)  
The Precinct, Level 2, 315 Brunswick St  
Fortitude Valley QLD 4006, AU;  
THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND (33.3%) y  
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
CALIFORNIA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SELDON, THERESE ANN;  
MUNSTER, DAVID JOHN;  
HART, DEREK NIGEL JOHN;  
JONES, MARTINA LOUISE;  
MUNRO, TRENT PHILLIP;  
MAHLER, STEPHEN MICHAEL;  
ZHOU, EUNICE YU y  
MARKS, JAMES D**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 762 622 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos anti-CD83 y uso de los mismos

**Campo**

5 La presente descripción se refiere a proteínas que se unen a CD83 y a usos de las mismas, por ejemplo, en terapia, profilaxis, diagnóstico o pronóstico.

**Antecedentes**

CD83

10 CD83 es una glicoproteína de membrana de tipo I de 45 kDa que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. CD83 es un marcador de la superficie celular expresado predominantemente en células dendríticas maduras (DCs, por sus siglas en inglés). CD83 se expresa mínimamente en DCs inmaduras en la sangre (BDC, por sus siglas en inglés) y DCs derivadas de monocitos (MoDC, por sus siglas en inglés). Debido a su expresión preferencial en DCs maduras, CD83 es un objetivo atractivo para la inmunoterapia.

Células dendríticas y control de las respuestas inmunes innatas y adaptativas

15 Las DCs enlazan los sistemas inmunes innato y cognado (adaptativo). La inmunidad innata es el principal impulsor de la activación inmune no específica como respuesta a agentes extraños. Las DCs inmaduras se especializan en la internalización de antígenos y se distribuyen a través de los tejidos periféricos permitiendo una vigilancia antigénica continua. Se denominan células presentadoras de antígenos profesionales (APCs, por sus siglas en inglés) por su capacidad para dirigir respuestas primarias de los linfocitos T, las DCs solo requieren cantidades mínimas de antígeno para iniciar una activación inmune.

20 Las DCs inmaduras están acopladas a una variedad de señales procedentes de material infeccioso y extraño, que desencadenan una diferenciación y maduración (también conocida como activación) de las DCs. Aunque las DCs maduras son capaces de capturar antígenos, este proceso de activación reduce la capacidad de estas células para internalizar un antígeno, en cambio regula al alza la liberación de citocinas, la expresión de marcadores de activación y el procesamiento de un antígeno para la presentación en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las DCs maduras cargadas con antígeno procesado pueden reclutar eficazmente linfocitos T, linfocitos B, granulocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés), monocitos y otras células del sistema inmune innato para amplificar la respuesta frente a un antígeno.

30 Las moléculas que se expresan tras la diferenciación y activación de las DCs ayudan a enlazar la inmunidad innata y la adaptativa. Las DCs maduras regulan al alza la expresión de los receptores de quimiocinas y las moléculas de adhesión tales como CD54, lo que facilita la migración de las DCs a los ganglios linfáticos para una incrementar la interacción con los linfocitos. La expresión de moléculas coestimuladoras, tales como CD80 y CD86, proporciona las señales coestimuladoras necesarias para la activación de los linfocitos T y el inicio de una respuesta inmune específica de un antígeno. La ligación de CD40 mejora la expresión de moléculas coestimuladoras e induce la liberación de IL-12 para facilitar la activación de los linfocitos T; a continuación los linfocitos T diferenciados organizan las interacciones complejas de la respuesta inmune adaptativa.

35 Dado que las DCs ejercen un control sobre las respuestas inmunes, las DCs activadas pueden verse como un objetivo para una intervención a lo largo de una serie de enfermedades inmunológicas, que incluyen las neoplasias malignas y las enfermedades autoinmunes.

40 Basándose en lo anterior, resultará evidente para una persona experta que los compuestos que se dirigen a las DCs pueden modular la respuesta inmune. En consecuencia, los compuestos que se unen a las DCs son deseables, por ejemplo, por sus usos terapéuticos, profilácticos, diagnósticos y de pronóstico.

**Compendio**

45 La presente descripción se basa en la producción de los inventores de un anticuerpo humano (mAb 3C12) que se une específicamente a CD83. El mAb 3C12 se obtuvo a partir de un banco de presentación en fagos de secuencias scFv humanas; el clon del fago scFv obtenido se reformateó como un mAb de IgG1.

Se demostró que el mAb 3C12 superaba a su equivalente policlonal, RA83, en ensayos de unión competitiva y retrasaba el inicio de la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD, por sus siglas en inglés) en ratones SCID trasplantados con un injerto xenogénico de PBMCs humanas.

50 Para mejorar la eficacia terapéutica del mAb 3C12, los inventores realizaron una maduración por afinidad de la cadena ligera para mejorar la afinidad del mAb 3C12 hacia CD83. Se obtuvieron cuatro nuevas variantes de scFv de 3C12 (3C12.B, 3C12.C, 3C12.D y 3C12.E) con secuencias distintas de la región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) y propiedades de unión mejoradas, en relación con el scFv de tipo silvestre. Los anticuerpos madurados por afinidad incluían sustituciones en las regiones estructurales (FRs) y determinantes de complementariedad (CDRs) de la V<sub>L</sub>.

El efecto de estas sustituciones no era predecible.

Los inventores también produjeron formas de mAb 3C12 capaces de inducir niveles mejorados de función efectora, en donde mAb 3C12.C defucosilado tenía una potencia comparable al anticuerpo policlonal, RA83.

5 La presente descripción se dirige a una proteína que se une a CD83 aislada o recombinante como se define en la reivindicación 1.

En un ejemplo, la CDR1 de  $V_H$  comprende los aminoácidos 31 a 35 de SEQ ID NO: 1, la CDR2 de  $V_H$  comprende los aminoácidos 50 a 59 de SEQ ID NO: 1 y la CDR3 de  $V_H$  comprende los aminoácidos 99 a 106 de SEQ ID NO: 1.

10 En un ejemplo, la CDR1 de  $V_H$  comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, la CDR2 de  $V_H$  comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 y la CDR3 de  $V_H$  comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4.

En un ejemplo, la CDR1 de  $V_L$  comprende los aminoácidos 24 a 34 de SEQ ID NO: 7, la CDR2 de  $V_L$  comprende los aminoácidos 50 a 56 de SEQ ID NO: 7 y la CDR3 de  $V_L$  comprende los aminoácidos 89 a 97 de SEQ ID NO: 7.

15 En un ejemplo, la CDR1 de  $V_L$  comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 17, la CDR2 de  $V_L$  comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 18, y la CDR3 de  $V_L$  comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 19.

En un ejemplo, la  $V_H$  y la  $V_L$  se encuentran en una sola cadena de polipéptido. Por ejemplo, la proteína que se une a CD83 es:

- (i) un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv); o
- (ii) un scFv dimérico (di-scFv); o
- 20 (iii) (i) o (ii) ligado a un Fc o un dominio constante de la cadena pesada ( $C_H$ ) 2 y/o  $C_H3$ ; o
- (iv) (i) o (ii) ligado a una proteína que se une a una célula efectora inmune.

En otro ejemplo, la  $V_L$  y  $V_H$  están en cadenas polipeptídicas distintas. Por ejemplo, la proteína que se une a CD83 es:

- (i) un diacuerpo; o
- 25 (ii) un triacuerpo; o
- (iii) un tetracuerpo; o
- (iv) un Fab; o
- (v) un  $F(ab')_2$ ; o
- (vi) un Fv; o
- 30 (vii) uno de (i) a (vi) ligado a un Fc o un  $C_H2$  y/o  $C_H3$ ; o
- (viii) uno de (i) a (vi) ligado a una proteína que se une a una célula efectora inmune.

35 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la descripción comprende un dominio que se une a antígeno que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo a CD83, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 29 y una secuencia de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 30.

Las proteínas que se unen a CD83 ejemplares de la presente descripción comprenden una  $V_H$  de la descripción y una cadena ligera o  $V_L$  quimérica, desinmunizada, humanizada, humana, humanizada sintética o primatizada.

En una forma ejemplar de la presente descripción, la proteína que se une a CD83 es un anticuerpo. El anticuerpo puede comprender:

40 una secuencia de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 29 y una secuencia de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 32.

En un ejemplo, el anticuerpo agota las células a las que se une, por ejemplo, células inmunes tales como células presentadoras de antígeno (APC) (por ejemplo, células dendríticas (DCs)) y/o linfocitos (por ejemplo, linfocitos T).

45 Como resultará evidente para el experto en la técnica a partir de la descripción en el presente documento, las proteínas que se unen a CD83 ejemplares son capaces de agotar las células a las que se unen sin conjugarse con

un compuesto tóxico.

5 En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 es capaz de inducir una función efectora, por ejemplo, una función efectora que da como resultado la muerte de una célula a la que se une el anticuerpo. Las funciones efectoras ejemplares incluyen la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 es capaz de inducir ADCC.

En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 comprende una región Fc de anticuerpo capaz de inducir una función efectora. Por ejemplo, la función efectora es la función efectora mediada por Fc. En un ejemplo, la región Fc es una región Fc de IgG1 o una región Fc de IgG3 o una región Fc híbrida de IgG1/IgG2.

10 En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 es capaz de inducir un nivel similar de función efectora (por ejemplo, que no es significativamente diferente o dentro de aproximadamente el 10%) o el mismo nivel de función efectora que una región Fc de IgG1 humana y/o IgG3 humana de tipo silvestre.

En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 es capaz de inducir un nivel mejorado de función efectora.

15 En un ejemplo, el nivel de función efectora inducido por la proteína que se une a CD83 aumenta con respecto al de la proteína que se une a CD83 cuando comprende una región Fc de IgG1 de tipo silvestre.

En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 está defucosilada o comprende una región Fc que está defucosilada.

20 En otro ejemplo, la proteína que se une a CD83 tiene un nivel más bajo de fucosilación, en comparación con un anticuerpo producido por una célula humana o CHO que no ha sido alterada para reducir el nivel de fucosilación de las proteínas. De acuerdo con este ejemplo, se entenderá que un nivel más bajo de fucosilación significa que en una composición que comprende la proteína que se une a CD83, el porcentaje de proteínas que se unen a CD83 fucosiladas (por ejemplo, grupos glicosilo fijados a Asn297 de un anticuerpo que comprende fucosa) es menor que el producido por una célula humana o CHO que no ha sido alterada para reducir el nivel de fucosilación de las proteínas.

25 Por ejemplo, la proteína que se une a CD83 es un anticuerpo defucosilado que comprende una  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 1 (o está codificada por una secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO: 35) y una  $V_L$  que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 7 (o está codificada por una secuencia de nucleótidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 38).

30 En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 comprende una  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 1 (o está codificada por una secuencia de nucleótidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 35) y una  $V_L$  que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 7 (o está codificada por una secuencia de nucleótidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 38) y se expresa en una célula de mamífero (por ejemplo, una célula CHO) que no expresa niveles detectables (o expresa niveles reducidos de) de  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferasa (FUT8) o se ha tratado con un inhibidor del procesamiento de N-glicano como la kifunensina.

35 En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 comprende una región Fc que comprende una o varias sustituciones en la secuencia de aminoácidos que potencian la función efectora inducida por el anticuerpo. Por ejemplo, una o varias de las sustituciones de la secuencia de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc hacia un receptor de Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R), en comparación con una región Fc que no comprende las sustituciones. Por ejemplo, una o varias de las sustituciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc hacia un Fc $\gamma$ R seleccionado a partir del grupo que consiste en Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIc y Fc $\gamma$ RIIIa, en comparación con una región Fc que no comprende las sustituciones.

40 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción es un anticuerpo sin conjugar o un fragmento del mismo que se une a antígeno.

En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción es un anticuerpo de longitud completa.

45 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción se une a CD83 con una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de  $5 \times 10^{-7}$  M o menos, tal como  $4,5 \times 10^{-7}$  M o menos, tal como  $4 \times 10^{-7}$  M o menos, tal como  $3,5 \times 10^{-7}$  M o menos, tal como  $3 \times 10^{-7}$  M o menos, tal como  $2,5 \times 10^{-7}$  M o menos, tal como  $2 \times 10^{-7}$  M o menos, tal como  $1,5 \times 10^{-7}$  M o menos, tal como  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, tal como  $9,5 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $9 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $8,5 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $8 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $7,5 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $7 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $6,5 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $6 \times 10^{-8}$  M o menos,  $5,5 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $4,5 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $4 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $3,5 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $3 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $2,5 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $2 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $1,5 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, tal como

9,5x10<sup>-9</sup> M o menos, tal como 9x10<sup>-9</sup> M o menos, tal como 8,5x10<sup>-9</sup> M o menos, tal como 8x10<sup>-9</sup> M o menos, tal como 7,5x10<sup>-9</sup> M o menos, tal como 7x10<sup>-9</sup> M o menos, tal como 6,5x10<sup>-9</sup> M o menos, tal como 6x10<sup>-9</sup> M o menos, tal como 5,5x10<sup>-9</sup> M o menos, tal como 5x10<sup>-9</sup> M.

5 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción se une a CD83 con una K<sub>D</sub> de aproximadamente 6x10<sup>-9</sup> M o menos, por ejemplo, 6,1x10<sup>-9</sup> M. En un ejemplo, la K<sub>D</sub> está entre aproximadamente 5,5x10<sup>-9</sup> M y aproximadamente 6,5x10<sup>-9</sup> M, por ejemplo, es aproximadamente 6x10<sup>-9</sup> M.

10 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción se une a CD83 con una tasa de asociación (K<sub>on</sub>) de 5x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 4,5x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 4x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 3,5x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 3x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 2,5x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 2x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 1,5x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 1x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 9,5x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 9x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 8,5x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 8x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 7,5x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 7x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 6,5x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 6x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 5,5x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 5x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 4,5x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 4x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 3,5x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 3x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 2,5x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 2x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 1,5x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos, tal como 1x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.

15 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción se une a CD83 con una K<sub>on</sub> de aproximadamente 1,5x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> o menos. En un ejemplo, la K<sub>D</sub> está entre aproximadamente 1,2x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> y aproximadamente 1,6x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, por ejemplo, es aproximadamente 1,3x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.

20 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción se disocia de CD83 con una tasa de disociación (K<sub>off</sub>) de 1,5x10<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 1x10<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 9,5x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 9x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 8,5x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 8x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 7,5x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 7x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 6,5x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 6x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 5,5x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 5x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 4,5x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 4x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 3,5x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 3x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 2,5x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 2x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 1,5x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 1x10<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 9,5x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 9x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 8,5x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 8x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 7,5x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> o menos, tal como 7x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>.

25 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción se disocia de CD83 con una K<sub>off</sub> de aproximadamente 8x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> o menos. En un ejemplo, la K<sub>D</sub> está entre aproximadamente 7x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> y aproximadamente 9x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>, por ejemplo, es aproximadamente 8x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>.

30 La descripción también incluye fragmentos, variantes y derivados del anticuerpo de la descripción.

En un ejemplo, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína que se une a CD83 de acuerdo con la presente descripción y un vehículo adecuado, por ejemplo, un vehículo, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 La presente descripción también proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica una proteína que se une a CD83 de la presente descripción.

Se analizan secuencias ejemplares de ácidos nucleicos en el contexto de la codificación de proteínas que se unen a CD83 de la descripción y se deben tomar para aplicar *mutatis mutandis* al presente ejemplo de la descripción.

En un ejemplo, el ácido nucleico de la descripción comprende una secuencia de nucleótidos tal y como se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 35, 38 o 44.

40 La presente descripción también proporciona un ácido nucleico capaz de hibridarse con un ácido nucleico de la descripción en condiciones de hibridación rigurosas de moderadas o altas.

La descripción también incluye fragmentos, homólogos y derivados de un ácido nucleico aislado de la descripción.

45 La presente descripción también proporciona una estructura artificial genética que comprende un ácido nucleico aislado o recombinante de la descripción y una o varias secuencias de nucleótidos adicionales, tales como un promotor ligado funcionalmente al ácido nucleico.

En un ejemplo, la estructura artificial genética es una estructura artificial de expresión que comprende un vector de expresión y un ácido nucleico aislado o recombinante de la descripción, en donde dicho ácido nucleico aislado o recombinante está ligado funcionalmente a uno o varios ácidos nucleicos reguladores en dicho vector de expresión.

50 En un ejemplo, la estructura artificial genética de la descripción comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, que comprende una V<sub>H</sub>) ligado funcionalmente a un promotor y un ácido nucleico que codifica otro polipéptido (por ejemplo, que comprende una V<sub>L</sub>) ligado funcionalmente a un promotor.

En otro ejemplo, la estructura artificial genética es una estructura artificial genética bicistrónica, por ejemplo, que comprende los siguientes componentes ligados funcionalmente en un orden de 5' a 3':

- (i) un promotor;
- (ii) un ácido nucleico que codifica un primer polipéptido;
- (iii) un sitio interno de entrada al ribosoma; y
- (iv) un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido.

5 Por ejemplo, el primer polipéptido comprende una  $V_H$  y el segundo polipéptido comprende una  $V_L$ , o el primer polipéptido comprende una  $V_L$  y el segundo polipéptido comprende una  $V_H$ .

La presente descripción también contempla estructuras artificiales genéticas distintas, una de las cuales codifica un primer polipéptido (por ejemplo, que comprende una  $V_H$ ) y otra de las cuales codifica un segundo polipéptido (por ejemplo, que comprende una  $V_L$ ) Por ejemplo, la presente descripción también proporciona una composición que comprende:

- (i) una primera estructura artificial genética que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, que comprende una  $V_H$ ) ligado funcionalmente a un promotor; y
- (ii) una segunda estructura artificial genética que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, que comprende una  $V_L$ ) ligado funcionalmente a un promotor.

15 La descripción también proporciona una célula que comprende una estructura artificial genética de acuerdo con la presente descripción.

En un ejemplo, la presente descripción proporciona una célula aislada que expresa una proteína que se une a CD83 de la descripción o una célula recombinante modificada genéticamente para expresar la proteína que se une a CD83 de la invención.

20 En un ejemplo, la célula comprende la estructura artificial genética de la descripción o:

- (i) una primera estructura artificial genética que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, que comprende una  $V_H$ ) ligado funcionalmente a un promotor; y
- (ii) una segunda estructura artificial genética que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido (p. ej., que comprende una  $V_L$ ) ligado funcionalmente a un promotor,

25 en donde el primero y el segundo polipéptido forman un anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno de la presente descripción.

La estructura artificial genética puede integrarse en la célula o permanecer episomal.

Los ejemplos de células de la presente descripción incluyen células bacterianas, células de levadura, células de insecto o células de mamífero.

30 También se describe en el presente documento un método para producir una proteína que se une a CD83 de la descripción, en donde el método comprende mantener la o las estructuras artificiales genéticas de la descripción en condiciones suficientes para que se produzca la proteína que se une a CD83.

El método para producir una proteína que se une a CD83 puede comprender cultivar la célula de la descripción en condiciones suficientes para que se produzca la proteína que se une a CD83 y, opcionalmente, para que se secrete.

35 El método para producir una proteína que se une a CD83 puede comprender adicionalmente aislar la proteína que se une a CD83.

También se describe en el presente documento un método para producir una proteína que se une a CD83 recombinante, en donde el método incluye las etapas de:

- (i) cultivar una célula que contiene un vector de expresión de acuerdo con la descripción de modo que la inmunoglobulina o el anticuerpo recombinante se exprese en dicha célula hospedadora; y
- (ii) aislar la proteína que se une a CD83 recombinante.

El método para producir una proteína que se une a CD83 puede comprender adicionalmente formular la proteína que se une a CD83 con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 También se describe en el presente documento un método para el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o una afección en un sujeto, en donde el método incluye la etapa de administrar la proteína que se une a CD83 de la descripción al sujeto para tratar o prevenir de ese modo la enfermedad o la afección.

El sujeto puede ser un mamífero.

El mamífero puede ser un ser humano.

El mamífero puede necesitar un tratamiento o profilaxis.

El mamífero que requiere ayuda puede padecer la enfermedad o la afección.

- 5 El mamífero que requiere ayuda puede tener un riesgo de desarrollar la enfermedad o la afección o de una recaída de la misma.

La presente descripción también proporciona el uso de una proteína que se une a CD83 de la descripción o de una composición de la descripción como medicamento.

- 10 También se describe en el presente documento el uso de una proteína que se une a CD83 de la descripción en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o una afección en un sujeto.

- 15 La presente descripción también proporciona una proteína que se une a CD83 de la descripción para uso en el tratamiento de miastenia gravis, esclerosis múltiple, vasculitis, enfermedades inflamatorias intestinales crónicas tales como Morbus Crohn o colitis ulcerosa, trastornos autoinmunes asociados con HLA B27 tales como Morbus Bechterew, y lupus eritematoso sistémico, enfermedades de la piel como psoriasis, artritis reumatoide y diabetes mellitus insulino dependiente.

En un ejemplo, la enfermedad o la afección está causada por la disfunción o la función no deseada del sistema inmune o por una respuesta celular que involucra células presentadoras de antígeno (APCs) (por ejemplo, células dendríticas (DCs)) y/o linfocitos (por ejemplo, linfocitos T) en un sujeto.

- 20 En otro ejemplo, la enfermedad o la afección es el rechazo de un injerto de tejido o de un órgano. Por ejemplo, el rechazo de un trasplante de tejido o de un órgano se produce como resultado de la enfermedad de injerto contra hospedador o la enfermedad de hospedador contra injerto.

- 25 En otro ejemplo, la enfermedad o la afección es el rechazo de un injerto de células madre, por ejemplo, un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT, por sus siglas en inglés) o un trasplante de sangre del cordón umbilical (UCBT, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, el rechazo del trasplante de células madre se produce como resultado de una enfermedad de injerto contra hospedador o de una enfermedad de hospedador contra injerto. El HSCT se puede producir, por ejemplo, a partir de la médula ósea directamente o a partir de la sangre periférica después de una movilización de las células desde la médula ósea (por ejemplo, mediante la administración de G-CSF).

- 30 El método puede comprender administrar una cantidad eficaz de la proteína que se une a CD83, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína que se une a CD83 al donante y/o al receptor. El injerto se puede poner en contacto con una cantidad eficaz de la proteína que se une a CD83 *ex vivo* o *in vivo*, antes o después del trasplante.

También se describe en el presente documento un método para regular a la baja la inmunoreactividad de un injerto alogénico, en donde el método comprende poner en contacto el injerto con una proteína que se une a CD83 o una composición de la descripción.

- 35 El injerto alogénico puede ser un injerto de células madre hematopoyéticas.

El injerto se puede poner en contacto con una proteína que se une a CD83 o una composición de la descripción *ex vivo*.

Al receptor del injerto se le puede administrar una proteína que se une a CD83 o una composición de la descripción antes y/o simultáneamente y/o después del trasplante del injerto.

40 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1: Análisis de la expresión y la purificación de IgG1 3C12

- 45 (A) Muestras no reducidas (NR) y reducidas con 2-mercaptoetanol (R) de material sobrenadante de un cultivo (i, iii) y 5 µg de material purificado por afinidad (ii, iv) se separaron en SDS-PAGE al 4-12% y se tiñeron con azul de Coomassie R250. (B) Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica de un anticuerpo 3C12 recombinante purificado con proteína A a 280 nm (panel superior) y 215 nm (panel central), y patrones de filtración en gel a 215 nm (panel inferior). La muestra no muestra una agregación detectable y tiene un peso molecular previsto de 145 kDa.

Figura 2: Análisis funcional de 3C12 purificado, una IgG anti-CD83 humana

- 50 (A) 25 µg·mL<sup>-1</sup> de IgG1 3C12 se une a las líneas celulares CD83<sup>+</sup>, KM-H2 y L428 y también a células FDCP1 transfectadas con CD83 humana (FDCP1 TF). No se observa ninguna diferencia entre 3C12 y un control de isotipo

5 IgG1 en las células FDCP1 no transfectadas (CD83-). MFI = intensidad media de la fluorescencia. (B) IgG1 3C12 inducía una lisis significativa de la línea celular KM-H2 con respecto a Herceptina (control negativo) a través de un mecanismo dependiente de CD16, con una relación efector a célula diana de 5:1. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de dos vías. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de cinco réplicas.

Figura 3: 3C12 reconoce un epítipo conformacional que se solapa con otros anticuerpos de CD83

10 (A) Transferencia Western de anticuerpos de CD83 utilizados para detectar 5 µg de CD83ECD-His humano recombinante (i) desnaturalizado o (ii) natural. CD83 no desnaturalizada aparece como tres bandas borrosas (30 kDa, 22 kDa, 19 kDa) sobre un gel al 12%, el resultado de la homodimerización y la variabilidad en la glicosilación de los tres posibles motivos de glicosilación ligados a N. Un anticuerpo secundario anti-IgG humana IRD800 aislado, se usó como control negativo. (Tabla añadida). El efecto de la adición simultánea de anticuerpos de CD83 a las células KM-H2 y el cambio resultante en la intensidad media de la fluorescencia para 3C12 y otros anticuerpos, se indicaban como una reducción porcentual.

Figura 4: mAb 3C12 mejora *in vivo* la supervivencia de ratones SCID en un modelo de GVHD xenogénica

15 Supervivencia de los animales después de la administración el día 0 del anticuerpo de CD83 o un control de isotipo emparejado a ratones SCID trasplantados con PBMCs humanas. El número de animales utilizados por cohorte se muestra entre paréntesis y las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) están marcadas con un asterisco. (A) Optimización de la dosis de IgG 3C12 en comparación con el control de isotipo (anti-Her2 humana; IgG de Herceptina). (B) Comparación de la dosis de 0,125 mg de IgG 3C12 con el anticuerpo policlonal RA83 de conejo o la IgG de conejo no específica (RAneg). Los datos mostrados se agrupan a partir de 5 experimentos independientes, cada uno con un mínimo de cinco animales en cada cohorte. (C) Administración de una dosis de 1 mg de anticuerpo de CD83 y dosis combinadas de tratamientos con 3C12 y RA83.

Figura 5: Glicomodificación de 3C12 con kifunensina produce IgG baja en fucosa

25 (A) La producción de 3C12 en presencia de 2 µg·mL<sup>-1</sup> de kifunensina (3C12.kif; panel superior) inhibe la adición de fucosa, mientras que la fucosa es un componente importante de los azúcares presentes en la transfección de 3C12 de control (3C12.WT; panel inferior) según se determina mediante espectrometría de masas MALDI TOF/TOF. Las estructuras producidas normalmente con cada señal predominante están anotadas y representadas esquemáticamente con fucosa (triángulos), GlcNAc (cuadrados), manosa (círculos gris oscuro) y galactosa (círculos gris claro). (B) 3C12.WT y 3C12.Kif tienen un peso molecular de IgG estándar (150 kDa no reducido (NR), y se observaron bandas de 50 kDa, 25 kDa tras la reducción (R)) y (C) el tratamiento con kifunensina no altera la actividad de la unión de IgG 3C12.kif (MFI = 2573, línea gris) a la línea celular CD83<sup>+</sup>, KM-H2, en comparación con 3C12.WT (MFI = 2581, línea negra superpuesta a la línea gris) en relación con el control de isotipo (MFI = 335, relleno gris).

Figura 6: Selección de scFv con afinidad mejorada hacia CD83 humano a partir de un banco aleatorio de V<sub>L</sub>

35 (A) Se tiñó levadura que presentaba scFv de 3C12 aleatorio de V<sub>L</sub> con hCD83<sub>ECD</sub>-His a las concentraciones indicadas para cada ronda y se clasificó en Selección P2 de recogida de alta afinidad y Selección P3 menos estricta para comparar. El porcentaje del total de células clasificadas en P2 y P3 se muestra dentro de la selección. La Ronda 3 clasificada incorpora una selección de clones con una tasa de disociación más lenta. (B) Regiones estructurales (FRs) deducidas y determinantes de complementariedad (CDRs) de la alineación de la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> de 3C12 y de variantes de V<sub>L</sub> mejoradas por afinidad. (C) Comparación de levadura monoclonal que expresa el tipo silvestre (3C12.WT) y variantes de 3C12 mejoradas por afinidad (3C12.B-E) que se unen a hCD83<sub>ECD</sub>-His 0,2 nM.

Figura 7: Caracterización de Fabs variantes aleatorios de V<sub>L</sub> de 3C12 reformateados

45 (A) Trazas de BiaCore muestran la unión de fragmentos Fab de 3C12.WT (panel superior) y 3C12.C (panel inferior) a hCD83<sub>ECD</sub>-Fc inmovilizado durante la inyección constante de Fab durante 3 minutos (180 s; Fase de asociación) seguido por la inyección de tampón durante 10 minutos (600 s; Fase de disociación). Se prepararon diluciones dobles de Fab en la serie de concentraciones especificada. (B) Series de diluciones de 3C12.WT (círculos), 3C12.C (cuadrados) y control de isotipo IgG (triángulos) que se unen a la línea celular CD83<sup>+</sup>, KM-H2.

Figura 8: La glicomodificación y la maduración por afinidad mejoran la actividad *in vitro* de CD83mAb

50 Potencia comparativa de 3C12.WT, 3C12.C y 3C12.kif *in vitro*. (A) Lisis específica de células BB88 transfectadas con CD83 después de 4 horas de incubación a 37°C con anticuerpo y células NK (relación 5:1 de efector a célula diana). Herceptina = control de isotipo IgG1k humano. (B) Efectos antiproliferativos de (i) variantes de 3C12 y (ii) en comparación con RA83 en MLR bidireccional. Los datos mostrados son el promedio ± SEM de cinco réplicas, representativos de 2-4 experimentos independientes.

55 Figura 9: Las células dendríticas de sangre CD83 *bright* son una diana del mAb anti-CD83 modificado

genéticamente *in vitro*

- 5 Efecto sobre las DCs de la sangre después de cultivar PBMC con  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de 3C12.C, control de isotipo IgG1k humano o sin tratamiento con anticuerpos durante tres días. (i) DCs en sangre activadas, vivas (7AAD<sup>-</sup>) se definen como células (= DC total) de linaje HLA-DR<sup>+</sup> (no se muestra la selección de HLA-DR) que coexpresan CMRF-44 y CD83. (ii) El número dentro de la selección de DC activada es el porcentaje de DCs total. Cada condición experimental se realizó por triplicado y los resultados presentados son representativos de 4 experimentos independientes.

Figura 10: La densidad del antígeno CD83 se correlaciona con los niveles de expresión de GFP y la potencia de ADCC *in vitro*

- 10 Caracterización de los transfectantes BB88 con niveles que varían de expresión de CD83; BB88-CD83-TF.5K (5.400MPC), BB88-CD83TF.3K (3.600MPC) o BB88-CD83TF.2K (<2.300MPC). (A) Niveles de expresión de GFP (izquierda) y CD83 detectados mediante HB15a en transfectantes BB88 (derecha). (B) ADCC inducida en un ensayo de liberación de cromo mediante (i) 3C12.C, (ii) 3C12.Kif o (iii) 3C12.C.Kif en transfectantes BB88 con una relación de efector a célula diana de 5:1. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM de cinco réplicas y los resultados presentados son representativos de 2 experimentos independientes.
- 15

Figura 11: 3C12.C tiene una potencia equivalente a RA83 *in vivo*

- 20 La supervivencia de los ratones SCID después de un trasplante de PBMC humanas xenogénicas y la administración de 0,125 mg de anticuerpo de CD83 o controles de anticuerpo con isotipo emparejado, el día 0. Los datos mostrados se agrupan a partir de dos experimentos que emplearon diferentes donantes humanos de PBMC (el número total de animales utilizados en cada cohorte se muestra entre paréntesis después de las descripciones de las cohortes). Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) están marcadas con un asterisco.

**Lista de secuencias**

SEQ ID NO:1	secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 3C12
SEQ ID NO:2	CDR1 de la región variable de la cadena pesada de 3C12
SEQ ID NO:3	CDR2 de la región variable de la cadena pesada de 3C12
SEQ ID NO:4	CDR3 de la región variable de la cadena pesada de 3C12
SEQ ID NO:5	secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 3C12
SEQ ID NO:6	secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 3C12.B
SEQ ID NO:7	secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 3C12.C
SEQ ID NO:8	secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 3C12.D
SEQ ID NO:9	secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 3C12.E
SEQ ID NO:10	secuencia de aminoácidos de la secuencia consenso de V <sub>L</sub> de 3C12 y derivados
SEQ ID NO:11	CDR1 de la región variable de la cadena ligera de 3C12
SEQ ID NO:12	CDR2 de la región variable de la cadena ligera de 3C12
SEQ ID NO:13	CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 3C12
SEQ ID NO:14	CDR1 de la región variable de la cadena ligera de 3C12.B
SEQ ID NO:15	CDR2 de la región variable de la cadena ligera de 3C12.B
SEQ ID NO:16	CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 3C12.B
SEQ ID NO:17	CDR1 de la región variable de la cadena ligera de 3C12.C
SEQ ID NO:18	CDR2 de la región variable de la cadena ligera de 3C12.C
SEQ ID NO:19	CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 3C12.C
SEQ ID NO:20	CDR1 de la región variable de la cadena ligera de 3C12.D
SEQ ID NO:21	CDR2 de la región variable de la cadena ligera de 3C12.D
SEQ ID NO:22	CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 3C12.D
SEQ ID NO:23	CDR1 de la región variable de cadena ligera de 3C12.E
SEQ ID NO:24	CDR2 de la región variable de cadena ligera de 3C12.E

## ES 2 762 622 T3

SEQ ID NO:25	CDR3 de la región variable de cadena ligera de 3C12.E
SEQ ID NO:26	secuencia de aminoácidos de la secuencia de consenso de V <sub>L</sub> de la CDR1 de 3C12 y derivados
SEQ ID NO:27	secuencia de aminoácidos de la secuencia de consenso de V <sub>L</sub> de la CDR2 de 3C12 y derivados
SEQ ID NO:28	secuencia de aminoácidos de la secuencia de consenso de V <sub>L</sub> de la CDR3 de 3C12 y derivados
SEQ ID NO:29	secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 3C12
SEQ ID NO:30	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 3C12
SEQ ID NO:31	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 3C12.B
SEQ ID NO:32	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 3C12.C
SEQ ID NO:33	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 3C12.D
SEQ ID NO:34	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 3C12.E
SEQ ID NO:35	secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de 3C12
SEQ ID NO:36	secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 3C12
SEQ ID NO:37	secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 3C12.B
SEQ ID NO:38	secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 3C12.C
SEQ ID NO:39	secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 3C12.D
SEQ ID NO:40	secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 3C12.E
SEQ ID NO:41	secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 3C12
SEQ ID NO:42	secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 3C12
SEQ ID NO:43	secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 3C12.B
SEQ ID NO:44	secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 3C12.C
SEQ ID NO:45	secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 3C12.D
SEQ ID NO:46	secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 3C12.E
SEQ ID NO:47	secuencia de aminoácidos de la isoforma a de CD83 humana
SEQ ID NO:48	secuencia de aminoácidos de la isoforma b de CD83 humana
SEQ ID NO:49	secuencia de aminoácidos de la isoforma c de CD83 humana
SEQ ID NO:50	cebador 3C12_VhFor
SEQ ID NO:51	cebador 3C12_VhRev
SEQ ID NO:52	cebador 3C12_VkFor
SEQ ID NO:53	cebador 3C12_VkRev
SEQ ID NO:54	cebador C12VH5'
SEQ ID NO:55	cebador Mod3C12VH3'

### Descripción detallada

#### General

- 5 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que se indique específicamente lo contrario o el contexto requiera lo contrario, se debe hacer referencia a una sola etapa, composición, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia para incluir una y una pluralidad (es decir, una o más) etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupos de composiciones de materia. Por lo tanto, tal y como se emplea en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el o la" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "un" incluye tanto uno solo como dos o más; la referencia a "una" incluye tanto una sola como dos o más; la referencia a "el o la" incluye tanto uno solo como dos o más, etc.
- 10

Cada ejemplo de la presente descripción descrito en el presente documento se aplicará *mutatis mutandis* a todos y cada uno de los otros ejemplos, a menos que se indique específicamente lo contrario.

La presente descripción se lleva a cabo sin una experimentación indebida utilizando, a menos que se indique lo

contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis de péptidos en solución, síntesis de péptidos en fase sólida e inmunología. Tales procedimientos se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, segunda edición (1989), vols. I, II y III en su totalidad; Benny K.C.Lo, *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, (2004) Humana Press, vol. 248; *DNA Cloning: A Practical Approach*, vols. I y II (D. N. Glover, compilador, 1985), IRL Press, Oxford, todo el texto; *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, compilador, 1984) IRL Press, Oxford, todo el texto, y particularmente los artículos en el mismo de Gait, pp1-22; Atkinson *et al.*, pp35-81; Sproat *et al.*, pp 83-115; y Wu *et al.*, pp 135-151; *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames & S. J. Higgins, compiladores, 1985) IRL Press, Oxford, todo el texto; *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford, todo el texto; Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, compiladores., Academic Press, Inc.), toda la serie; J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" en: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany); Sakakibara *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73: 336-342, 1976; Merrifield *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154, 1963; Barany y Merrifield (1979) en *The Peptides* (Gross, E. y Meienhofer, J. compiladores), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wunsch, E., compilador (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Müller, E., compilador), vol. 15, 4ª ed, partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky *Int. J. Peptide Protein Res.* 25: 449-474, 1985; *Handbook of Experimental Immunology*, vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, compiladores, 1986, Blackwell Scientific Publications); y *Animal Cell Culture: Practical Approach*, 3ª ed. (John R. W. Masters, compilador, 2000), ISBN 0199637970, todo el texto.

El término "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" se debe entender que significa "X e Y" o "X o Y" y se considerará que proporciona un soporte explícito para ambos significados o para cualquier significado.

A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa indicados, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

#### Definiciones seleccionadas

CD83 es una proteína de membrana de tipo I de paso único y miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Se han encontrado tres variantes de transcritos humanos que codifican diferentes isoformas. Para fines de nomenclatura y no como una limitación, las secuencias de aminoácidos de las isoformas humanas de CD83 (hCD83) se muestran en SEQ ID NO: 47 (NP\_004224.1; isoforma a), SEQ ID NO: 48 (NP\_001035370.1; isoforma b) y SEQ ID NO: 49 (NP\_001238830.1; isoforma c). Por consiguiente, en un ejemplo, la secuencia de aminoácidos de CD83 humana comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 47, 48 o 49. Los homólogos de CD83 se pueden encontrar en *Pan troglodytes* (XP\_518248.2), *Macaca mulatta* (XP\_001093591.1), *Canis lupus familiaris* (XP\_852647.1), *Bos Taurus* (NP\_001040055.1), *Mus musculus* (NP\_033986.1), *Rattus norvegicus* (NP\_001101880.1) y *Gallus gallus* (XP\_418929.1). Las proteínas que se unen a CD83 a modo de ejemplo de la descripción se unen o se unen específicamente a hCD83, incluyendo sus formas recombinantes (rhCD83).

La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" significa una proteína o un polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de obtención, no está asociado con componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado natural; está sustancialmente exento de otras proteínas procedentes de la misma fuente. Una proteína se puede volver sustancialmente exenta de componentes asociados de forma natural o estar sustancialmente purificada mediante aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas conocidas en la técnica. Por "sustancialmente purificada" se entiende que la proteína está sustancialmente exenta de agentes contaminantes, por ejemplo, al menos aproximadamente un 70% o 75% u 80% u 85% o 90% o 95% o 96% o 97% o 98% o 99% exenta de agentes contaminantes.

Se entenderá que el término "recombinante" significa el producto de una recombinación genética artificial. Por consiguiente, en el contexto de una proteína recombinante que comprende un dominio que se une a antígeno, este término no incluye un anticuerpo que se presenta de forma natural dentro del cuerpo de un sujeto que es el producto de una recombinación natural que ocurre durante la maduración de los linfocitos B. Sin embargo, si se aísla un anticuerpo de ese tipo, se debe considerar una proteína aislada que comprende un dominio que se une a antígeno. De manera similar, si el ácido nucleico que codifica la proteína se aísla y se expresa usando medios recombinantes, la proteína resultante es una proteína recombinante que comprende un dominio que se une a antígeno. Una proteína recombinante también incluye una proteína expresada por medios recombinantes artificiales cuando está dentro de una célula, un tejido o un sujeto, por ejemplo, en el que se expresa.

La expresión "proteína que se une a CD83" se considerará que incluye una cadena polipeptídica única (es decir, una serie de aminoácidos contiguos unidos por enlaces peptídicos), o una serie de cadenas polipeptídicas unidas covalentemente o no covalentemente entre sí (es decir, un complejo polipeptídico o proteína) capaz de unirse a CD83 de la manera descrita y/o reivindicada en esta memoria. Por ejemplo, las series de cadenas de polipéptidos se

pueden unir covalentemente usando un enlace químico o de disulfuro adecuado. Los ejemplos de enlaces no covalentes incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrófobas.

El término "polipéptido" o "cadena de polipéptidos" se entenderá a partir del párrafo anterior que significa una serie de aminoácidos contiguos unidos por enlaces peptídicos.

- 5 Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "dominio que se une a antígeno" se debe entender como una región de un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a un antígeno, es decir, una  $V_H$  o una  $V_L$  o un Fv que comprende tanto una  $V_H$  como una  $V_L$ . El dominio que se une a antígeno no tiene que estar en el contexto de un anticuerpo completo, por ejemplo, puede estar aislado (por ejemplo, un dominio de anticuerpo) o en otra forma (por ejemplo, scFv).
- 10 Para los fines de la presente descripción, el término "anticuerpo" incluye una proteína capaz de unirse específicamente a uno o algunos antígenos estrechamente relacionados (por ejemplo, CD83) en virtud de un dominio que se une a antígeno contenido dentro de un Fv. Este término incluye anticuerpos de cuatro cadenas (p. ej., dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H)), anticuerpos recombinantes o modificados genéticamente (p. ej., anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos con CDRs injertadas, anticuerpos primatizados, anticuerpos desinmunizados, anticuerpos humanizados sintéticos, semi-anticuerpos, anticuerpos biespecíficos). Un anticuerpo generalmente comprende dominios constantes, que se pueden estructurar en una región constante o un fragmento constante o un fragmento cristalizante (Fc). Las formas ejemplares de anticuerpos comprenden una estructura de cuatro cadenas como su unidad básica. Los anticuerpos de longitud completa comprenden dos cadenas pesadas (de ~50 a 70 kDa cada una) unidas covalentemente y dos cadenas ligeras (de ~23 kDa cada una). Una cadena ligera generalmente comprende una región variable (si está presente) y un dominio constante, y en mamíferos es o bien una cadena ligera  $\kappa$  o una cadena ligera  $\lambda$ . Una cadena pesada generalmente comprende una región variable y uno o dos dominios constantes unidos por una región bisagra a uno o varios dominios constantes adicionales. Las cadenas pesadas de mamífero son de uno de los siguientes tipos  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  o  $\mu$ . Cada cadena ligera también está unida covalentemente a una de las cadenas pesadas. Por ejemplo, las dos cadenas pesadas y las cadenas pesada y ligera se mantienen unidas por enlaces disulfuro intercatenarios y por interacciones no covalentes. El número de enlaces disulfuro intercatenarios puede variar entre los diferentes tipos de anticuerpos. Cada cadena tiene una región variable N-terminal ( $V_H$  o  $V_L$  en donde cada una tiene una longitud de ~110 aminoácidos) y uno o varios dominios constantes en el extremo C-terminal. El dominio constante de la cadena ligera (CL que tiene una longitud de ~110 aminoácidos) está alineado y unido por disulfuro con el primer dominio constante de la cadena pesada ( $C_H1$  que tiene una longitud de 330 a 440 aminoácidos). La región variable de la cadena ligera está alineada con la región variable de la cadena pesada. La cadena pesada del anticuerpo puede comprender 2 o más dominios  $C_H$  adicionales (tales como,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y similares) y puede comprender una región bisagra entre los dominios constantes  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ . Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo murino (ratón o rata) o un anticuerpo de primate (tal como de ser humano). En un ejemplo, el anticuerpo está humanizado, es humanizado sintético, quimérico, está injertado con CDRs o desinmunizado.

La expresión "anticuerpo sin conjugar" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con otro compuesto, por ejemplo, un compuesto tóxico o radiomarcado.

- 40 Tal y como se usa en el presente documento, "región variable" se refiere a las porciones de las cadenas ligeras y/o pesadas de un anticuerpo tal y como se ha definido en el presente documento, que es capaz de unirse específicamente a un antígeno e incluye secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad (CDRs), es decir, CDR1, CDR2 y CDR3, y regiones estructurales (FRs). Por ejemplo, la región variable comprende tres o cuatro FRs (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y opcionalmente FR4) junto con tres CDRs.  $V_H$  se refiere a la región variable de la cadena pesada.  $V_L$  se refiere a la región variable de la cadena ligera.

- Tal y como se emplea en el presente documento, la expresión "regiones determinantes de complementariedad" (CDRs sin., es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los residuos de aminoácidos de la región variable de un anticuerpo cuya presencia los vuelve los principales contribuyentes a la unión específica de un antígeno. Cada dominio de la región variable ( $V_H$  o  $V_L$ ) normalmente tiene tres regiones CDRs identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. En un ejemplo, las posiciones de aminoácidos asignadas a las CDRs y FRs se definen de acuerdo con "Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991" (también denominado en este documento "el sistema de numeración de Kabat"). En otro ejemplo, las posiciones de aminoácidos asignadas a las CDRs y FRs se definen de acuerdo con "Enhanced Chothia Numbering Scheme" (<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>). Según el sistema de numeración de Kabat, las FRs y CDRs de  $V_H$  están situadas de la siguiente manera: residuos 1 a 30 (FR1), 31 a 35 (CDR1), 36 a 49 (FR2), 50 a 65 (CDR2), 66 a 94 (FR3), 95 a 102 (CDR3) y 103 a 113 (FR4). Según el sistema de numeración de Kabat, las FRs y CDRs de  $V_L$  están situadas de la siguiente manera: residuos 1 a 23 (FR1), 24 a 34 (CDR1), 35 a 49 (FR2), 50 a 56 (CDR2), 57 a 88 (FR3), 89 a 97 (CDR3) y 98 a 107 (FR4). La presente descripción no se limita a las FRs y CDRs definidas por el sistema de numeración de Kabat, sino que incluye todos los sistemas de numeración, incluido el sistema de numeración canónico o de Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342: 877-883, 1989; y/o Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273: 927-948, 1997; el sistema de numeración de Honnegger y Plückthun J.

Mol. Biol. 309: 657-670, 2001; o el sistema IMGT descrito en Giudicelli et al., Nucleic Acids Res. 25: 206-211 1997. En un ejemplo, las CDRs se definen de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Opcionalmente, la CDR2 de la cadena pesada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, no comprende los cinco aminoácidos C-terminales indicados en esta memoria o uno cualquiera o más de esos aminoácidos están sustituidos por otro aminoácido de origen natural. En una opción adicional, o alternativa, la CDR1 de la cadena ligera no comprende los cuatro aminoácidos N-terminales indicados en esta memoria o uno cualquiera o varios de esos aminoácidos están sustituidos por otro aminoácido de origen natural. A este respecto, Padlan et al., FASEB J., 9: 133-139, 1995 establecieron que los cinco aminoácidos C-terminales de la CDR2 de la cadena pesada y/o los cuatro aminoácidos N-terminales de la CDR1 de la cadena ligera no están implicados generalmente en la unión al antígeno.

10 Las "regiones estructurales" (FRs) son aquellos residuos de la región variable distintos de los residuos de las CDRs.

Tal y como se emplea en el presente documento, el término "Fv" se considerará que significa cualquier proteína, o bien compuesta por múltiples polipéptidos o por un solo polipéptido, en la cual una  $V_L$  y una  $V_H$  se asocian y forman un complejo que tiene un dominio que se une a antígeno que es capaz de unirse específicamente a un antígeno. La  $V_H$  y la  $V_L$  que forman el dominio que se une a antígeno pueden estar en una sola cadena polipeptídica o en diferentes cadenas polipeptídicas. Además, un Fv de la descripción (así como cualquier proteína de la descripción) puede tener múltiples dominios que se unen a antígeno que pueden unirse o no al mismo antígeno. Se entenderá que este término incluye fragmentos obtenidos directamente a partir de un anticuerpo, así como proteínas correspondientes a ese fragmento producido usando medios recombinantes. En algunos ejemplos, la  $V_H$  no está unida a un dominio constante de la cadena pesada ( $C_H$ ) 1 y/o la  $V_L$  no está unida a un dominio constante de la cadena ligera ( $C_L$ ). Los ejemplos de polipéptidos o proteínas que contienen Fv incluyen un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab'), un scFv, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un complejo de orden superior, o cualquiera de los anteriores unido a una región constante o un dominio de la misma, por ejemplo, el dominio  $C_{H2}$  o  $C_{H3}$ , por ejemplo, un minicuerpo.

25 Un "fragmento Fab" consiste en un fragmento que se une a antígeno monovalente de una inmunoglobulina, y se puede producir mediante la digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína, para producir un fragmento que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada, o se puede producir usando medios recombinantes.

30 Se puede obtener un "fragmento Fab'" de un anticuerpo tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de una reducción, para producir una molécula que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada que comprende una  $V_H$  y un solo dominio constante. Se obtienen dos fragmentos Fab' por cada anticuerpo tratado de esta manera. También se puede producir un fragmento Fab' por medios recombinantes.

Un fragmento "F(ab')<sub>2</sub>" de un anticuerpo consiste en un dímero de dos fragmentos Fab' unidos entre sí por dos enlaces disulfuro, y se obtiene tratando una molécula de anticuerpo completa con la enzima pepsina, sin una reducción posterior.

35 Un fragmento "Fab<sub>2</sub>" es un fragmento recombinante que comprende dos fragmentos Fab unidos usando, por ejemplo, una cremallera de leucina o un dominio  $C_{H3}$ .

Un "Fv de cadena única" o "scFv" es una molécula recombinante que contiene el fragmento de la región variable (Fv) de un anticuerpo en el que la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada están unidas covalentemente por un enlazador polipeptídico adecuado, flexible.

40 Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "se une" haciendo referencia a la interacción de una proteína que se une a CD83 o un dominio que se une a antígeno de la misma con un antígeno, significa que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o un epítipo) en el antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo se une al epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo "A" (o "A" libre y sin marcar), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de "A" marcado unida al anticuerpo.

45 Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente" o "específicamente se une" se debe entender que una proteína de la descripción reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con un antígeno o una célula particular, expresándose igual que con antígenos o células alternativas. Por ejemplo, una proteína que se une específicamente a un antígeno, se une a ese antígeno con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que como se une a otros antígenos. Por ejemplo, una proteína se une a CD83 (p. ej., hCD83) con una afinidad materialmente superior que como lo hace a otros ligandos de la superfamilia de inmunoglobulinas o a antígenos comúnmente reconocidos por anticuerpos naturales polirreactivos (es decir, por anticuerpos naturales conocidos porque se unen a una variedad de antígenos encontrados de forma natural en los seres humanos). También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, una proteína que se une específicamente a un primer antígeno, puede unirse o no específicamente a un segundo antígeno. De este modo, una "unión específica" no requiere necesariamente una unión exclusiva o una unión no detectable de otro antígeno, esto se entiende por la expresión "unión selectiva". En un ejemplo, la "unión específica"

de una proteína que se une a CD83 de la descripción, con un antígeno, significa que la proteína se une al antígeno con una constante de equilibrio ( $K_D$ ) de 100 nM o menos, tal como 50 nM o menos, por ejemplo, 20 nM o menos, tal como 15 nM o menos o 10 nM o menos o 5 nM o menos o 1 nM o menos o 500 pM o menos o 400 pM o menos o 300 pM o menos o 200 pM o menos o 100 pM o menos.

5 Tal y como se usa en el presente documento, el término "epítopo" (sinónimo de "determinante antigénico") se debe entender que significa una región de CD83 a la que se une una proteína que comprende un dominio que se une a antígeno de un anticuerpo. Este término no se limita necesariamente a los residuos o la estructura específica con los que la proteína entra en contacto. Por ejemplo, este término incluye la región que incluye los aminoácidos puestos en contacto con la proteína y/o al menos 5 a 10 o 2 a 5 o 1 a 3 aminoácidos fuera de esta región. En algunos  
10 ejemplos, el epítopo es una serie lineal de aminoácidos. Un epítopo también puede comprender una serie de aminoácidos discontinuos que se colocan uno cerca del otro cuando se pliega CD83, es decir, un "epítopo conformacional". El experto en la materia también sabrá que el término "epítopo" no se limita a péptidos o polipéptidos. Por ejemplo, el término "epítopo" incluye agrupaciones de moléculas de superficie químicamente, activas tales como cadenas laterales de azúcar, cadenas laterales de fosforilo o cadenas laterales de sulfonilo y, en  
15 ciertos ejemplos, puede tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítopo o péptido o polipéptido que las comprende se puede administrar a un animal para generar anticuerpos contra el epítopo.

Se entenderá que la expresión "inhibe competitivamente" significa que una proteína que se une a CD83 de la descripción reduce o evita la unión de un anticuerpo indicado a CD83, por ejemplo, a hCD83. Esto se puede deber a  
20 que la proteína (o el dominio que se une a antígeno) se une al mismo o a un epítopo solapante que el anticuerpo. De lo anterior resultará evidente que la proteína no tiene que inhibir completamente la unión del anticuerpo, sino que solo necesita reducir la unión en una cantidad estadísticamente significativa, por ejemplo, en al menos aproximadamente un 10% o 20% o 30% o 40% o 50% o 60% o 70% u 80% o 90% o 95%. Los métodos para determinar una inhibición competitiva de una unión se conocen en la técnica y/o se describen en este documento.  
25 Por ejemplo, el anticuerpo se expone a CD83 tanto en presencia como en ausencia de la proteína. Si se une menos anticuerpo en presencia de la proteína que en ausencia de la proteína, se considera que la proteína inhibe competitivamente la unión del anticuerpo. En un ejemplo, la inhibición competitiva de la unión se debe al dominio que se une a antígeno de la proteína sobre CD83 que se solapa con el dominio que se une a antígeno del anticuerpo.

30 El "solapamiento" en el contexto de dos epítopos significa que dos epítopos comparten una cantidad suficiente de residuos de aminoácidos para permitir que una proteína de unión de la descripción se una a un epítopo, para inhibir competitivamente la unión de un anticuerpo indicado a CD83 que se une con el otro epítopo. Por ejemplo, los epítopos "solapantes" comparten al menos 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o 10 o 11 o 12 o 13 o 14 o 15 o 16 o 17 o  
18 o 19 o 20 aminoácidos.

35 Tal y como se emplea en el presente documento, una "afección o enfermedad asociada a CD83" se refiere a cualquier afección o enfermedad causada por o asociada con CD83 o una célula que expresa CD83. El experto en la materia podrá determinar fácilmente tales afecciones o enfermedades basándose en la descripción en el presente documento y/o realizando un ensayo para diagnosticar una afección o enfermedad asociada a CD83. A este respecto, en algunos ejemplos, la afección o enfermedad es una afección o enfermedad inflamatoria, o una afección  
40 o enfermedad autoinmune. En este documento se incluye una descripción de afecciones y enfermedades ejemplares.

Tal y como se emplea en el presente documento, los términos "previniendo", "prevenir" o "prevención" incluyen administrar una proteína de la descripción para detener o dificultar de este modo el desarrollo de al menos un  
45 síntoma de una afección o enfermedad. Este término también incluye el tratamiento de un sujeto en remisión para prevenir u obstaculizar una recaída. Por ejemplo, un sujeto que padece esclerosis múltiple recurrente-remitente, se trata durante la remisión para evitar de ese modo una recaída.

Tal y como se emplea en el presente documento, los términos "tratando", "tratar" o "tratamiento" incluyen la administración de una proteína descrita en el presente documento para reducir o eliminar de este modo al menos un  
síntoma de una afección o enfermedad específica.

50 Tal y como se emplea en el presente documento, el término "sujeto" se entenderá que significa cualquier animal, tal como un mamífero. En un ejemplo, el mamífero es un primate humano o no humano. En un ejemplo, el mamífero es un ser humano.

La referencia en el presente documento a una "muestra" debe entenderse como una referencia a cualquier muestra  
55 obtenida a partir de un sujeto tal como, pero no limitada a, un fluido corporal (por ejemplo, sangre o una fracción de sangre tal como suero o plasma, lágrimas, orina, fluido sinovial o líquido cefalorraquídeo), material celular (por ejemplo, aspirado de tejido), muestras de una biopsia de tejido o muestras quirúrgicas. En algunos ejemplos, la "muestra" es una cualquiera o varias entre suero, plasma, PBMCs o una fracción de una capa leucocitaria.

Tal y como se emplea en el presente documento, el término "diagnóstico" y sus variantes, tales como, entre otras,

"diagnosticar", "diagnosticado" o "diagnosticando" incluyen cualquier diagnóstico primario de un estado clínico o el diagnóstico de una enfermedad recurrente.

5 "Pronóstico", "pronosticar" y variantes de los mismos, tal y como se usan en este documento, se refieren la posible valoración o el curso de una enfermedad, incluyendo la posibilidad de recuperación o la recurrencia o el resultado de un tratamiento.

La expresión "estructura artificial de expresión" debe tomarse en su contexto más amplio e incluye un ácido nucleico que comprende una o varias secuencias promotoras ligadas funcionalmente con uno o varios ácidos nucleicos, tal y como se describe en el presente documento.

10 La expresión "vector de expresión" se refiere a un ácido nucleico que comprende una estructura artificial de expresión que además es capaz de conservar y/o replicar un ácido nucleico en un formato expresable. Por ejemplo, un vector de expresión puede comprender un plásmido, un bacteriófago, un fagémido, un cósmido, un fragmento subgenómico o genómico de un virus. Una selección de vectores apropiados está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

15 Tal y como se emplea en el presente documento, el término "promotor" debe tomarse en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras de la transcripción de un gen genómico, incluyendo la caja TATA o el elemento iniciador, que se requiere para el inicio preciso de la transcripción, con o sin elementos reguladores adicionales (p. ej., secuencias activadoras aguas arriba, sitios de unión del factor de transcripción, potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión de un ácido nucleico, por ejemplo, como respuesta a un estímulo del desarrollo y/o externo, o de una manera específica del tejido. En el presente contexto, el término "promotor" también se usa para describir un ácido nucleico recombinante, sintético o de fusión, o un derivado que confiere, activa o mejora la expresión de un ácido nucleico al que está ligado funcionalmente. Los promotores ejemplares pueden contener copias adicionales de uno o varios elementos reguladores específicos para mejorar aún más la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de dicho ácido nucleico.

25 Tal y como se emplea en el presente documento, la expresión "ligado funcionalmente a" significa posicionar un promotor con respecto a un ácido nucleico de tal manera que la expresión del ácido nucleico esté controlada por el promotor. Un promotor puede estar ligado funcionalmente a numerosos ácidos nucleicos, por ejemplo, a través de un sitio interno de entrada al ribosoma.

Proteínas que comprenden dominios de unión a antígeno

#### Anticuerpos

30 *Métodos basados en bancos*

La presente descripción también incluye la exploración de bancos de anticuerpos o proteínas que comprenden dominios que se unen a antígeno de los mismos (por ejemplo, que comprenden regiones variables de los mismos) para identificar una proteína que se une a CD83 de la descripción. Por ejemplo, un banco que comprende una V<sub>H</sub> de la descripción y una pluralidad de regiones V<sub>L</sub> se puede escrutar para identificar una proteína que se une a CD83 de la descripción.

40 Los ejemplos de bancos contemplados por esta descripción incluyen bancos sin manipular (procedentes de sujetos sin estimular), bancos inmunizados (procedentes de sujetos inmunizados con un antígeno) o bancos sintéticos. Los anticuerpos que codifican el ácido nucleico o regiones del mismo (por ejemplo, regiones variables) se clonan mediante técnicas convencionales (por ejemplo, tal como se describe en Sambrook y Russell, compiladores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> ed., vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) y se utilizan para codificar y mostrar proteínas utilizando un método conocido en la técnica. Otras técnicas para producir bancos de proteínas se describen, por ejemplo, en los documentos US6300064 (por ejemplo, un banco HuCAL de Morphosys AG), US5885793, US6204023, US6291158 o US6248516.

45 Las proteínas que se unen a CD83 de acuerdo con la descripción pueden ser proteínas secretadas solubles o se pueden presentar como una proteína de fusión en la superficie de una célula o partícula (por ejemplo, un fago u otro virus, un ribosoma o una espora). Se conocen en la técnica diversos formatos de banco de presentación. Por ejemplo, el banco es un banco de presentación *in vitro* (por ejemplo, un banco de presentación en ribosomas, banco de presentación covalente o banco de presentación en ARNm, por ejemplo, tal como se describe en el documento US7270969). En otro ejemplo más, el banco de presentación es un banco de presentación en fagos en el que las proteínas que comprenden dominios de anticuerpos que se unen a antígeno, se expresan en fagos, por ejemplo, tal como se describe en los documentos US6300064, US5885793, US6204023, US6291158 o US6248516. Otros métodos de presentación en fagos son conocidos en la técnica y se contemplan en la presente descripción. De manera similar, los métodos de presentación en células se contemplan en la descripción, por ejemplo, bancos de presentación bacterianos, por ejemplo, tal como se describen en el documento US5516637; bancos de presentación en levadura, por ejemplo, tal como se describen en el documento US6423538; o un banco de presentación en mamíferos.

Los métodos para escrutar bancos de presentación son conocidos en la técnica. En un ejemplo, se examina un banco de presentación de la presente descripción usando la purificación por afinidad, por ejemplo, tal como se describe en Scopes (en: Protein purification: principles and practice, tercera edición, Springer Verlag, 1994). Los métodos de purificación por afinidad normalmente implican poner en contacto proteínas que comprenden dominios que se unen a antígeno mostrados por el banco, con un antígeno diana (por ejemplo, CD83) y, después del lavado, eluir aquellos dominios que permanecen unidos al antígeno.

Cualquier región variable o scFv identificado mediante un escrutinio, se modifica fácilmente en un anticuerpo completo, si se desea. Los métodos ejemplares para modificar o reformatear regiones variables o scFvs en un anticuerpo completo se describen, por ejemplo, en Jones et al., J. Immunol. Methods 354: 85-90, 2010; o Jostock et al., J. Immunol. Methods, 289: 65-80, 2004. Alternativa o adicionalmente, se utilizan métodos de clonación estándar, por ejemplo, tal como se describen en Ausubel et al., (En: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) y/o (Sambrook et al., (En: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, tercera edición 2001).

En un ejemplo, la presente descripción proporciona un método para producir o aislar una proteína que se une a CD83 de la descripción mediante el escrutinio de un banco de presentación, por ejemplo, un banco de presentación en fagos, por ejemplo, tal como se describe en los documentos US6300064 y/o US5885793. Por ejemplo, los presentes inventores han aislado scFvs mediante la bioclasificación de un banco de genes de inmunoglobulina de scFvs humanos, mediante tres rondas de selección frente al dominio extracelular recombinante de CD83 humana. Una vez aislada, una proteína que se une a CD83 de la invención se puede clonar y expresar y, opcionalmente, reformatear, por ejemplo, como un anticuerpo IgG1 usando métodos conocidos en la técnica.

En un ejemplo, la presente descripción proporciona un método para producir una proteína que se une a CD83, en donde el método comprende:

(i) escrutar una preparación o un banco de proteínas que se unen a CD83 en busca de una proteína de unión que se une al dominio extracelular de CD83, por ejemplo, el dominio extracelular de CD83 humana recombinante; y

(ii) aislar una proteína que se une a CD83 que tiene una afinidad de unión deseada hacia el dominio extracelular de CD83.

En un ejemplo, se escruta una preparación de proteína que se une a CD83. Se puede obtener una preparación de CD83, por ejemplo, inmunizando un animal con un antígeno CD83 de modo que se producen anticuerpos que reaccionan con el dominio extracelular de CD83.

En otro ejemplo, se escruta un banco de proteínas que se unen a CD83. El banco puede ser un banco de fagos, por ejemplo, un banco de fagos de scFv o un banco de fagos de Fab.

En un ejemplo, el método comprende producir una población de partículas de fago que presentan en su superficie una población de moléculas de unión que tienen un intervalo de especificidades de unión para un epítipo o un antígeno CD83 diana. Tales partículas de fago comprenden un genoma de fagémido que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de unión. Ese ácido nucleico se puede aislar, clonar y expresar en un sistema recombinante para producir la proteína que se une a CD83 de la invención.

Proteínas que se unen a CD83 desinmunizadas, quiméricas, humanizadas, humanizadas sintéticas, primatizadas, humanas y compuestas

Las proteínas que se unen a CD83 de la presente descripción pueden ser proteínas injertadas con CDRs que incluyen CDRs de un anticuerpo de una especie no humana (por ejemplo, ratón o rata o primate no humano) injertadas o insertadas en FRs de un anticuerpo humano o que incluyen CDRs de un anticuerpo procedente de un tipo de anticuerpo (p. ej., un tipo de anticuerpo humano) injertado o insertado en FRs procedentes de otro tipo de anticuerpo (p. ej., otro tipo de anticuerpo humano). Este término también incluye una proteína compuesta que comprende, por ejemplo, una o varias regiones variables injertadas con CDRs y una o varias, por ejemplo, regiones variables humanas, regiones variables quiméricas, regiones variables humanizadas sintéticas o regiones variables primatizadas.

Las proteínas que se unen a CD83 de la presente descripción pueden ser proteínas humanizadas.

La expresión "proteína humanizada" se debe entender que se refiere a una proteína que comprende una región variable similar a la humana, que incluye CDRs de un anticuerpo procedente de una especie humana (por ejemplo, ratón o rata o primate no humano) injertadas o insertadas en FRs procedentes de un anticuerpo no humano (este tipo de anticuerpo también se conoce como "anticuerpo injertado con CDRs"). Las proteínas humanizadas también incluyen proteínas en las que uno o varios residuos de la proteína humana se modifican mediante una o varias sustituciones de aminoácidos, y/o uno o varios residuos de FRs de la proteína humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Las proteínas humanizadas también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo humano ni en el anticuerpo no humano. Cualquier región adicional de la proteína (por

ejemplo, una región Fc) es generalmente humana. La humanización se puede realizar usando un método conocido en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en los documentos US5225539, US6054297, US7566771 o US5585089. La expresión "proteína humanizada" también incluye una proteína superhumanizada, por ejemplo, tal como se describe en el documento US7732578. Esta expresión también incluye una proteína compuesta que comprende, por ejemplo, una o varias regiones variables humanizadas y una o varias, por ejemplo, regiones variables humanas, regiones variables quiméricas, regiones variables humanizadas sintéticas o regiones variables primatizadas.

En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 humanizada comprende las regiones entre 27d y 34, 50 y 55, y 89 y 96 en una secuencia de la cadena ligera descrita en el presente documento; y 31 y 35b, 50 y 58, y 95 y 101 en una secuencia de la cadena pesada descrita en el presente documento (numeración según el sistema de numeración de Kabat). A este respecto, Padlan et al., FASEB J., 9: 133-139, 1995 presentan una evidencia de que esas regiones son las más propensas a unirse o ponerse en contacto con el antígeno.

Las proteínas que se unen a CD83 de la presente descripción pueden ser proteínas humanas. La expresión "proteína humana", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas que tienen regiones de anticuerpo variables y, opcionalmente, constantes encontradas en los seres humanos, por ejemplo, en la línea germinal humana o en células somáticas o a partir de bancos producidos usando tales regiones. Los anticuerpos "humanos" pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas, por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutaciones aleatorias o dirigidas al sitio *in vitro* (en particular mutaciones que implican sustituciones conservadoras o mutaciones en un pequeño número de residuos de la proteína, por ejemplo, en 1, 2, 3, 4 o 5 de los residuos de la proteína). Estos "anticuerpos humanos" no se tienen que generar necesariamente como resultado de una respuesta inmune de un ser humano, sino que se pueden generar usando medios recombinantes (por ejemplo, escrutinio de un banco de presentación en fagos) y/o a través de un animal transgénico (por ejemplo, un ratón) que comprende ácido nucleico que codifica regiones constantes y/o variables de un anticuerpo humano y/o empleando una selección guiada (por ejemplo, tal y como se describe en el documento US5565332). Esta expresión también incluye formas maduradas por afinidad de tales anticuerpos. Para los fines de la presente descripción, también se considerará que una proteína humana incluye una proteína que comprende FRs de un anticuerpo humano o FRs que comprenden secuencias de una secuencia de consenso de FRs humanas y en donde una o varias de las CDRs son aleatorias o semialeatorias, por ejemplo, tal y como se describe en los documentos US6300064 y/o US6248516.

Las proteínas que se unen a CD83 humana ejemplares son anticuerpos que comprenden las siguientes parejas de regiones variables:

(i) una secuencia de  $V_H$  como se muestra en SEQ ID NO: 1 y una secuencia de  $V_L$  como se muestra en SEQ ID NO: 5; o

(ii) una secuencia de  $V_H$  como se muestra en SEQ ID NO: 1 y una secuencia de  $V_L$  como se muestra en SEQ ID NO: 6;

(iii) una secuencia de  $V_H$  como se muestra en SEQ ID NO: 1 y una secuencia de  $V_L$  como se muestra en SEQ ID NO: 7; o

(iv) una secuencia de  $V_H$  como se muestra en SEQ ID NO: 1 y una secuencia de  $V_L$  como se muestra en SEQ ID NO: 8; o

(v) una secuencia de  $V_H$  como se muestra en SEQ ID NO: 1 y una secuencia de  $V_L$  como se muestra en SEQ ID NO: 9.

En un ejemplo, la secuencia de  $V_L$  carece del residuo de lisina C-terminal. La lisina C-terminal de la secuencia de  $V_L$  de una proteína que se une a CD83 de la descripción, se puede eliminar, por ejemplo, durante la producción o la purificación de la proteína que se une a CD83, o mediante una modificación genética recombinante del ácido nucleico que codifica la  $V_L$  de la proteína que se une a CD83. En consecuencia, las proteínas que se unen a CD83 pueden comprender poblaciones con todos los residuos de lisina C-terminal de la  $V_L$  eliminados, poblaciones sin eliminación de los residuos de lisina C-terminal de la  $V_L$ , o poblaciones que tienen una mezcla de proteínas con y sin el residuo de lisina C-terminal de  $V_L$ . En algunos ejemplos, las poblaciones de proteínas pueden comprender adicionalmente proteínas que tienen dos  $V_L$ s en las que el residuo de lisina C-terminal se elimina en una de las  $V_L$ s. De manera similar, una composición de proteínas puede comprender la misma mezcla o una similar de poblaciones de proteínas con o sin el residuo de lisina C-terminal de  $V_L$ .

Opcionalmente, la  $V_H$  está unida a una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada de IgG1. En un ejemplo, la región constante de la cadena pesada carece del residuo de lisina C-terminal.

Opcionalmente, la  $V_L$  está unida a una región constante de la cadena ligera.

Las proteínas que se unen a CD83 de la presente descripción pueden ser proteínas humanizada sintéticas. La

expresión "proteína humanizada sintética" se refiere a una proteína preparada por un método descrito en el documento US20080095767. Una proteína que se une a CD83 humanizada sintética incluye una región variable de un anticuerpo, en donde la región variable comprende FRs de una región variable de anticuerpo de primate del Nuevo Mundo y CDRs de una región variable de anticuerpo de primate que no es del Nuevo Mundo. Por ejemplo, una proteína que se une a CD83 humanizada sintética incluye una región variable de un anticuerpo, en donde la región variable comprende FRs de una región variable de anticuerpo de primate del Nuevo Mundo y CDRs de un anticuerpo de ratón o rata. En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 humanizada sintética es un anticuerpo que se une a CD83 en el que una o ambas de las regiones variables están humanizadas de forma sintética. Esta expresión también incluye una proteína compuesta que comprende, por ejemplo, una o varias regiones variables humanizadas sintéticas y una o varias, por ejemplo, regiones variables humanas o regiones variables humanizadas o regiones variables quiméricas.

Las proteínas que se unen a CD83 de la presente descripción pueden ser proteínas primatizadas. Una "proteína primatizada" comprende una o varias regiones variables de un anticuerpo generado después de la inmunización de un primate no humano (por ejemplo, un macaco cangrejero). Opcionalmente, las regiones variables del anticuerpo de primate no humano están unidas a regiones constantes humanas para producir un anticuerpo primatizado. Los métodos ejemplares para producir anticuerpos primatizados se describen en el documento US6113898. Esta expresión también incluye una proteína compuesta que comprende, por ejemplo, una o varias regiones variables primatizadas y una o varias, por ejemplo, regiones variables humanas o regiones variables humanizadas o regiones variables quiméricas.

En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la descripción es una proteína quimérica. La expresión "proteínas quiméricas" se refiere a proteínas en las que un dominio que se une a antígeno procede de una especie particular (por ejemplo, un murino, tal como un ratón o una rata) o que pertenece a una clase o subclase de un anticuerpo particular, mientras que el resto de la proteína procede de una proteína obtenida a partir de otra especie (como, por ejemplo, primate humano o no humano) o pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo. En un ejemplo, una proteína quimérica es un anticuerpo quimérico que comprende una  $V_H$  y/o una  $V_L$  de un anticuerpo no humano (por ejemplo, un anticuerpo murino) y las regiones restantes del anticuerpo proceden de un anticuerpo humano. La producción de tales proteínas quiméricas se conoce en la técnica, y se puede lograr por medios convencionales (como se describe, por ejemplo, en los documentos US6331415; US5807715; US4816567 y US4816397). Esta expresión también incluye una proteína compuesta que comprende, por ejemplo, una o varias regiones variables quiméricas y una o varias, por ejemplo, regiones variables humanas o regiones variables humanizadas o regiones variables quiméricas.

La presente descripción también contempla una proteína que se une a CD83 desinmunizada, por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO2000/34317 y US20070292416. Los anticuerpos y proteínas desinmunizados tienen uno o varios epítomos, por ejemplo, epítomos de linfocitos B o epítomos de linfocitos T que se han eliminado (es decir, mutado) para reducir de ese modo la probabilidad de que un sujeto genere una respuesta inmune contra el anticuerpo o la proteína. Por ejemplo, se analiza una proteína que se une a CD83 de la descripción para identificar uno o varios epítomos de linfocitos B o T y se mutan uno o varios residuos de aminoácidos dentro del epítomo para reducir de ese modo la inmunogenicidad de la proteína que se une a CD83.

A partir de la descripción anterior, será evidente para el experto en la técnica que una proteína "compuesta" comprende una forma de  $V_H$  (p. ej., humana) y otra forma de  $V_L$  (por ejemplo, humanizada). La presente descripción incluye explícitamente todas las combinaciones de formas de  $V_H$  y  $V_L$ .

#### Otras proteínas que se unen a CD83 que comprenden un dominio que se une a antígeno

La presente descripción también contempla otras proteínas que se unen a CD83 que comprenden una región variable o un dominio que se une a antígeno de un anticuerpo, tal como:

- (i) un anticuerpo de dominio único, que es una cadena polipeptídica única que comprende toda o una porción de la  $V_H$  o una  $V_L$  de un anticuerpo, por ejemplo, tal como se describe en el documento US6248516;
- (ii) diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, por ejemplo, tal como se describen en los documentos US5844094 y/o US2008152586;
- (iii) scFvs, por ejemplo, tal como se describen en el documento US5260203;
- (iv) minicuerpos, por ejemplo, tal como se describen en el documento US5837821;
- (v) proteínas biespecíficas de "llave y cerradura", por ejemplo, tal como se describen en el documento US5731168;
- (vi) proteínas heteroconjugadas, por ejemplo, tal como se describen en el documento US4676980;
- (vii) proteínas heteroconjugadas producidas usando un reticulador químico, por ejemplo, tal como se describen en el documento US4676980;

(viii) fragmentos Fab'-SH, por ejemplo, tal como se describen en Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225, 1992; o

(ix) Fab3, por ejemplo, tal como se describe en el documento EP19930302894.

Fusiones de dominio constante

5 La presente descripción incluye proteínas que se unen a CD83 que comprenden un dominio que se une a antígeno de un anticuerpo y una región constante o Fc o un dominio del mismo, por ejemplo, un dominio C<sub>H</sub>2 y/o C<sub>H</sub>3. Las regiones y/o dominios constantes adecuados serán evidentes para el experto en la materia y/o las secuencias de tales polipéptidos se encuentran disponibles con facilidad en bases de datos disponibles públicamente. Kabat *et al.* también proporcionan una descripción de algunas regiones/dominios constantes adecuados.

10 Las regiones constantes y/o los dominios de las mismas son útiles para proporcionar actividades biológicas tales como dimerización, semivida sérica prolongada (p. ej., mediante la unión a FcRn), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

15 La presente descripción también contempla proteínas que se unen a CD83 que comprenden regiones o dominios constantes mutantes, por ejemplo, tal como se describen en los documentos US7217797; US7217798; o US20090041770 (que tiene una semivida incrementada) o US7355008 (aumento de ADCC).

20 La lisina C-terminal de la región constante de la cadena pesada de una proteína que se une a CD83 de la descripción que comprende una región constante o Fc, se puede eliminar, por ejemplo, durante la producción o la purificación de la proteína que se une a CD83, o mediante una modificación genética recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada de la proteína que se une a CD83. En consecuencia, las proteínas que se unen a CD83 pueden comprender poblaciones con todos los residuos de lisina C-terminal de la región constante de la cadena pesada eliminados, poblaciones sin eliminación de los residuos de lisina C-terminal de la región constante de la cadena pesada, o poblaciones que tienen una mezcla de proteínas con y sin el residuo de lisina C-terminal de la región constante de la cadena pesada. En algunos ejemplos, las poblaciones de proteínas pueden comprender  
25 adicionalmente proteínas que tienen dos regiones constantes de la cadena pesada en las que el residuo de lisina C-terminal de la región constante de la cadena pesada se elimina en una de las regiones constantes de la cadena pesada. De manera similar, una composición de proteínas puede comprender la misma mezcla o una similar de poblaciones de proteínas con o sin el residuo de lisina C-terminal de la región constante de la cadena pesada.

Mejora de la función efectora

30 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción puede inducir una función efectora o una función efectora mejorada.

35 En el contexto de la presente descripción, "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas mediadas por células o proteínas que se unen a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo lo que da como resultado la muerte de una célula. Los ejemplos de funciones efectoras inducidas por anticuerpos incluyen: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP); y activación de linfocitos B.

40 La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a la lisis de células diana recubiertas con anticuerpos mediante células efectoras (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales ("NK"), neutrófilos y macrófagos) que tienen receptores de Fc que reconocen la región Fc del anticuerpo unido. Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica ("PBMC") y células NK.

En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción se une a CD83 en la superficie de una célula, de tal manera que es capaz de inducir una función efectora, tal como ADCC y/o CDC.

45 Por ejemplo, la proteína que se une a CD83 permanece unida a CD83 en la superficie de la célula durante un tiempo suficiente para inducir una función efectora, tal como ADCC y/o CDC.

50 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción es capaz de inducir una función efectora mejorada, por ejemplo, gracias a una región Fc modificada genéticamente o gracias a comprender una región capaz de unirse a una célula efectora inmune. Por ejemplo, el nivel de función efectora aumenta en comparación con el nivel inducido por una región Fc de IgG1 o IgG3 humana. La mejora de la función efectora inducida por una proteína que se une a CD83 de la descripción puede dar como resultado efectos terapéuticos o profilácticos mejorados, por ejemplo, al destruir o agotar las células que causan una afección, por ejemplo, células presentadoras de antígeno (APCs) (por ejemplo, células dendríticas (DCs)) y/o linfocitos (p. ej., linfocitos T) que modulan las respuestas inmunes aberrantes o no deseadas, por ejemplo, en afecciones o enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. En  
55 un ejemplo, la mejora de la función efectora evita una estimulación alógena de los linfocitos T, por ejemplo,

destruyendo o agotando las células CD83+ que estimulan los linfocitos T alogénicos.

En un ejemplo, la región Fc de una proteína que se une a CD83 de la descripción se modifica para aumentar el nivel de función efectora que es capaz de inducir, en comparación con la región Fc sin la modificación. Tales modificaciones pueden ser a nivel de aminoácidos y/o a nivel estructural secundario y/o a nivel estructural terciario y/o la glicosilación de la región Fc.

El destinatario experto apreciará que una mayor función efectora puede manifestarse de varias maneras, por ejemplo, tal como un mayor nivel de efecto, un efecto más sostenido o una tasa de efecto más rápida.

En un ejemplo, la región Fc comprende una o varias modificaciones de aminoácidos que aumentan su capacidad para inducir una función efectora mejorada. En un ejemplo, la región Fc se une con mayor afinidad a uno o varios FcγRs, tal como FcγRIII. En un ejemplo, la región Fc comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada a partir del grupo que consiste en: 230, 233, 234, 235, 239, 240, 243, 264, 266, 272, 274, 275, 276, 278, 302, 318, 324, 325, 326, 328, 330, 332 y 335, numerados según el índice EU de Kabat. En un ejemplo, la región Fc comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos S239D/I332E, numeradas de acuerdo con el índice UE de Kabat. Esa región Fc tiene un aumento de la afinidad hacia FcγRIIIa de aproximadamente 14 veces en comparación con una región Fc de tipo silvestre y una capacidad incrementada en aproximadamente 3.3 para inducir una ADCC en comparación con una región Fc de tipo silvestre. En un ejemplo, la región Fc comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos S239D/A330L/I332E, numeradas según el índice UE de Kabat. Esa región Fc tiene un aumento de la afinidad hacia FcγRIIIa de aproximadamente 138 veces en comparación con una región Fc de tipo silvestre y una capacidad incrementada en aproximadamente 323 veces para inducir una ADCC en comparación con una región Fc de tipo silvestre.

Las sustituciones de aminoácidos adicionales que aumentan la capacidad de una región Fc para inducir una función efectora se conocen en la técnica y/o se describen, por ejemplo, en los documentos US6737056 o US7317091.

En un ejemplo, la glicosilación de la región Fc se altera para aumentar su capacidad para inducir una función efectora mejorada. A este respecto, los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero normalmente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que generalmente está fijado por un enlace de N a la Asn297 del dominio C<sub>H</sub>2 dominio de la región Fc. El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa fijada a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunos ejemplos, las regiones Fc de acuerdo con la presente descripción comprenden una estructura de carbohidrato que carece de fucosa fijada (directa o indirectamente) a una región Fc, es decir, la región Fc está "desfucosilada" o "afucosilada". Esas variantes pueden tener una capacidad mejorada para inducir ADCC. Los métodos para producir anticuerpos desfucosilados incluyen, expresar el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno en una línea celular incapaz de expresar una α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) (por ejemplo, tal como se describe en Yumane-Ohnuki et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 87: 614-622, 2004), que expresa el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno en células que expresan un pequeño ARN interferente contra FUT8 (por ejemplo, tal como se describe en Mori et al., *Biotechnol. Bioengineer.*, 88: 901-908, 2004), que expresa el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno en células incapaces de expresar guanosina difosfato (GDP)-manosa 4,6-deshidratasa (GMD) (por ejemplo, tal como se describe en Kanda et al., *J. Biotechnol.*, 130: 300-310, 2007). La presente descripción también contempla el uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a antígeno que tiene un nivel reducido de fucosilación, por ejemplo, producido usando una línea celular modificada genéticamente para expresar β-(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III) (por ejemplo, tal como se describe en Umana et al., *Nat. Biotechnol.* 17: 176-180, 1999).

En un ejemplo, un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción está desfucosilado. Por ejemplo, el anticuerpo se produce en una célula (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula CHO) que no expresa FUT8 o se trata con un inhibidor del procesamiento de N-glicanos, como la kifunensina.

Otros métodos incluyen el uso de líneas celulares que producen inherentemente anticuerpos capaces de inducir una función efectora mejorada mediada por Fc (por ejemplo, células madre obtenidas a partir de embriones de pato para la producción de vacunas virales, documento US20100062489; producción de proteínas recombinantes en células aviares EBX<sup>®</sup>, documento US20100226912).

Las proteínas que se unen a CD83 de la presente descripción también incluyen aquellas con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en donde un oligosacárido biantenarico fijado a la región Fc está bisectado por GlcNAc. Tales inmunoglobulinas pueden tener una fucosilación reducida y/o una función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de un anticuerpo de ese tipo o un fragmento del mismo que se une a antígeno, por ejemplo, en los documentos US6602684 y US20050123546.

También se contemplan proteínas que se unen a CD83 con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a la región Fc. Tales inmunoglobulinas pueden tener una función CDC mejorada. Esas inmunoglobulinas se describen, por ejemplo, en los documentos WO1997/30087 y WO1999/22764.

Las proteínas que se unen a CD83 también pueden comprender una región Fc capaz de inducir niveles mejorados

de CDC. Por ejemplo, híbridos de IgG1 e IgG3 producen anticuerpos que tienen una actividad CDC mejorada (Natsume et al., Cancer Res. 68: 3863-3872, 2008).

5 Las proteínas que se unen a CD83 también se pueden fusionar o conjugar o alternativamente con proteínas (por ejemplo, regiones variables de anticuerpos) que se unen a células efectoras inmunes, por ejemplo, en virtud de la unión a CD3 o CD16.

10 Los métodos para determinar una función efectora son conocidos en la técnica. En un ejemplo, el nivel de actividad ADCC se evalúa utilizando un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr, un ensayo de liberación de europio o un ensayo de liberación de <sup>35</sup>S. En cada uno de estos ensayos, las células que expresan CD83 se cultivan durante un tiempo con uno o varios de los compuestos mencionados y en condiciones suficientes para que la célula absorba el compuesto. En el caso de un ensayo de liberación de <sup>35</sup>S, las células se pueden cultivar con metionina y/o cisteína marcada con <sup>35</sup>S durante un tiempo suficiente para que los aminoácidos marcados se incorporen a las proteínas recién sintetizadas. Después, las células se cultivan en presencia o ausencia de la proteína y en presencia de células efectoras inmunes, por ejemplo, PBMCs y/o células NK. La cantidad de <sup>51</sup>Cr, europio y/o <sup>35</sup>S se detecta después en el medio de cultivo celular, y un aumento de la presencia de proteína en comparación con la ausencia de inmunoglobulina indica que la molécula/agente de unión tiene una función efectora. Las publicaciones ejemplares que describen ensayos para evaluar el nivel de ADCC inducido por una inmunoglobulina, incluyen Hellstrom et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83: 7059-7063, 1986 y Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166: 1351-1361, 1987.

15 Otros ensayos para evaluar el nivel de ADCC inducido por una inmunoglobulina incluyen un ensayo de citotoxicidad no radioactiva ACT1™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. CA, EE.UU.) o un ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96® (Promega, WI, EE.UU.).

20 Alternativa o adicionalmente, la función efectora de una proteína que se une a CD83 se evalúa determinando su afinidad hacia uno o varios FcγRs, por ejemplo, tal como se describe en el documento US7317091.

25 Los ensayos de unión a C1q también se pueden llevar a cabo para confirmar que la proteína que se une a CD83 puede unirse a C1q y puede inducir CDC. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163, 1996).

30 En otro ejemplo, la proteína que se une a CD83 comprende una o varias sustituciones de aminoácidos que aumentan la semivida de la proteína. Por ejemplo, la proteína que se une a CD83 comprende una región constante que comprende una o varias sustituciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la región constante hacia la región Fc neonatal (FcRn). Por ejemplo, la región constante tiene una afinidad incrementada hacia FcRn a pH más bajo, por ejemplo, aproximadamente un pH de 6,0, para facilitar la unión de Fc/FcRn en un endosoma. En un ejemplo, la región constante tiene una afinidad incrementada hacia FcRn aproximadamente a un pH de 6 en comparación con su afinidad a aproximadamente pH 7,4, lo que facilita la liberación de nuevo de Fc en la sangre después del reciclaje celular. Esas sustituciones de aminoácidos son útiles para extender la semivida de una proteína que se une a CD83, al reducir el aclaramiento desde la sangre.

35 Las sustituciones de aminoácidos ejemplares incluyen T250Q y/o M428L o T252A, T254S y T266F o M252Y, S254T y T256E o H433K y N434F de acuerdo con el sistema de numeración de EU. Se describen sustituciones de aminoácidos adicionales o alternativas, por ejemplo, en los documentos US20070135620 o US7083784.

#### Proteínas que se unen a CD83 mutantes

40 La presente descripción también proporciona una proteína que se une a CD83 o un ácido nucleico que la codifica con al menos un 80% de identidad con una secuencia descrita en el presente documento. En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 o un ácido nucleico de la descripción comprende una secuencia que es al menos aproximadamente 80% u 81% u 82% u 83% u 84% u 85% o 90% o 95% o 96% o 97% o 98% o 99% idéntica a una secuencia descrita en este documento, en donde la proteína se une específicamente a CD83.

45 Alternativa o adicionalmente, la proteína que se une a CD83 comprende una CDR (por ejemplo, tres CDRs) que es al menos aproximadamente 30% o 35% o 40% o 45% o 50% o 55% o 60% o 65% o 70% o 75% o 80% o 85% o 90% o 95% o 97% o 98% o 99% idéntica a la o las CDRs de una V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> tal y como se describe en el presente documento de acuerdo con cualquier ejemplo, en donde la proteína es capaz de unirse específicamente a CD83. A este respecto, los inventores han producido numerosos anticuerpos que tienen diversas secuencias dentro de sus CDRs. Los métodos para determinar la unión de una proteína CD83 se describen en esta memoria.

50 Por ejemplo, los inventores han identificado un grupo de proteínas que se unen a CD83 que comparten al menos aproximadamente un 60% de identidad en su CDR1 de la cadena ligera, como, por ejemplo, con al menos aproximadamente un 65% o 70% o 75% u 80% u 85% o 90% o 95% o 96% o 97% o 98% o 99% de identidad en su CDR1 de la cadena ligera, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

55 Los inventores también han identificado un grupo de proteínas que se unen a CD83 que comparten una identidad del 70% en su CDR2 de la cadena ligera, como, por ejemplo, con al menos aproximadamente un 75% u 80% u 85% o 90% o 95% o 96% o 97% o 98% o 99% de identidad en su CDR2 de la cadena ligera, de acuerdo con el sistema

de numeración de Kabat.

Los inventores también han identificado un grupo de proteínas que se unen a CD83 que comparten una identidad del 30% en su CDR3 de la cadena ligera, como, por ejemplo, con al menos aproximadamente un 35% o 40% o 45% o 50% o 55% o 60% o 65 % o 70% o 75% u 80% u 85% o 90% o 95% o 96% o 97% o 98% o 99% de identidad en su CDR3 de la cadena ligera, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Tal y como se describe en esta memoria, los cuatro aminoácidos N-terminales de una CDR1 de la cadena ligera se pueden eliminar, o uno cualquiera o varios de esos aminoácidos se puede sustituir por otro aminoácido natural (Padlan et al., FASEB J., 9: 133-139, 1995). Por lo tanto, una proteína que se une a CD83 de la descripción puede comprender una CDR1 que tiene al menos aproximadamente un 70% de identidad con una secuencia de CDR1 de la cadena ligera descrita en el presente documento.

En otro ejemplo, un ácido nucleico de la descripción comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 80% u 85% o 90% o 95% o 97% o 98% o 99% idéntica a una secuencia descrita en el presente documento y que codifica una proteína que se une a CD83 que es capaz de unirse específicamente a CD83. La presente descripción también incluye ácidos nucleicos que codifican una proteína que se une a CD83 de la descripción, que difiere de una secuencia ejemplificada en este documento como resultado de la degeneración del código genético.

El % de identidad de un ácido nucleico o polipéptido se determina mediante un análisis GAP (Needleman y Wunsch. Mol. Biol. 48, 443-453, 1970) (programa GCG) con una penalización por creación de hueco = 5 y una penalización por extensión de hueco = 0,3. La secuencia de la búsqueda tiene al menos 50 residuos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 50 residuos. Por ejemplo, la secuencia de la búsqueda tiene al menos 100 residuos de longitud y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 residuos. Por ejemplo, las dos secuencias están alineadas a lo largo de toda su longitud.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la presente descripción también contempla un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un ácido nucleico que codifica una proteína que se une a CD83 descrita en este documento, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una  $V_H$  o  $V_L$  de un anticuerpo 3C12, 3C12.B, 3C12.C, 3C12.D o 3C12.E. Un "rigor moderado" se define en este documento como una hibridación y/o un lavado llevado a cabo en tampón 2 x SSC, SDS al 0,1% (p/v) a una temperatura en el intervalo de 45°C a 65°C, o condiciones equivalentes. Un "rigor elevado" se define en el presente documento como una hibridación y/o un lavado llevado a cabo en tampón 0,1 x SSC, SDS al 0,1% (p/v), o una concentración de sal inferior, y a una temperatura de al menos 65°C, o condiciones equivalentes. La referencia en este documento a un nivel particular de rigor incluye condiciones equivalentes que usan soluciones de lavado/hibridación distintas de SSC, conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los métodos para calcular la temperatura a la cual se disociarán las hebras de un ácido nucleico bicatenario (también conocida como temperatura de fusión, o  $T_m$ ) se conocen en la técnica. Una temperatura que es similar a (por ejemplo, en 5°C o en 10°C) o igual a la  $T_m$  de un ácido nucleico, se considera muy rigurosa. Se debe considerar que el rigor medio está dentro de 10°C a 20°C o 10°C a 15°C de la  $T_m$  calculada del ácido nucleico.

La presente descripción también contempla formas mutantes de una proteína que se une a CD83 de la descripción que comprenden una o varias sustituciones conservadoras de aminoácidos, en comparación con una secuencia descrita en este documento. En algunos ejemplos, la proteína que se une a CD83 comprende 10 o menos, por ejemplo, 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o 1 sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácido" es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral y/o una hidropaticidad y/o una hidrofilia similar.

Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, e incluyen las cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), las cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), las cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), las cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), las cadenas laterales  $\beta$  ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y las cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Los índices hidropáticos se describen, por ejemplo, en Kyte y Doolittle J. Mol. Biol., 157: 105-132, 1982 y los índices hidrofílicos se describen, por ejemplo, en el documento US4554101.

La presente descripción también contempla cambios de aminoácidos no conservadores. Por ejemplo, de particular interés son las sustituciones de aminoácidos cargados por otro aminoácido cargado y por aminoácidos neutros o cargados positivamente. En algunos ejemplos, la proteína que se une a CD83 comprende 10 o menos, por ejemplo, 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o 1 sustituciones de aminoácidos no conservadoras.

En un ejemplo, la o las mutaciones se producen dentro de una FR de un dominio que se une a antígeno de una proteína que se une a CD83 de la descripción. En otro ejemplo, la o las mutaciones se producen dentro de una CDR de una proteína que se une a CD83 de la descripción.

Los métodos ejemplares para producir formas mutantes de una proteína que se une a CD83 incluyen:

- mutagénesis del ADN (Thie et al., Methods Mol. Biol. 525: 309-322 2009) o del ARN (Kopsidas et al., Immunol. Lett. 107: 163-168, 2006; Kopsidas et al. BMC Biotechnology, 7: 18, 2007; y el documento WO1999/058661);
  - introducir un ácido nucleico que codifica el polipéptido en una célula mutadora, por ejemplo, células bacterianas XL-1Red, XL-mutS y XL-mutS-Kanr (Stratagene);
- 5
- mezclar aleatoriamente el ADN, por ejemplo, tal como se describe en Stemmer, Nature 370: 389-91, 1994; y
  - mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, tal como se describe en Dieffenbach (compilador) y Dveksler (compilador) (en: PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1995).

10 Los métodos ejemplares para determinar la actividad biológica de las proteínas que se unen a CD83 mutantes de la descripción serán evidentes para el experto en la técnica y/o se describen en el presente documento, por ejemplo, la unión a antígeno. Por ejemplo, en el presente documento se describen métodos para determinar la unión al antígeno, la inhibición competitiva de la unión, la afinidad, la asociación, la disociación y la eficacia terapéutica.

Proteínas que se unen a CD83 a modo de ejemplo

En las Tablas 1 y 2 se describen ejemplos de proteínas que se unen a CD83 que contienen regiones variables ejemplares, producidas por los inventores y sus ácidos nucleicos codificadores.

15 Tabla 1: Secuencias de ejemplos de proteínas que se unen a CD83 y ácidos nucleicos codificadores

	Nombre del anticuerpo	SEQ ID NO de aminoácidos de V <sub>H</sub>	SEQ ID NO de nucleótidos de la cadena V <sub>H</sub>	SEQ ID NO de aminoácidos de V <sub>L</sub>	SEQ ID NO de nucleótidos de la cadena V <sub>L</sub>
1	3C12	1	35	5	36
2	3C12.B	1	35	6	37
3	3C12.C	1	35	7	38
4	3C12.D	1	35	8	39
5	3C12E	1	35	9	40

Tabla 2: Sustituciones de aminoácidos en V<sub>L</sub> (en relación con SEQ ID NO: 5) de proteínas que se unen a CD83 ejemplares

	Nombre del anticuerpo	Sustitución en V <sub>L</sub>
1	3C12.B	I2V; L10F, L15I; T20S; A25T; K30S; Y32H; F33L; R39K; T51A; N53S; E70D; F83I; L91V; G92N; A93S; L96Y; G100Q; K103R
2	3C12.C	M4L; L10S; L15V; K30R; F33L; R39K; A43V; N53T; G66R; Q79H; L91V; G92D; A93R; Y94F; L96Y; G100Q; L104V
3	3C12.D	V3Q; L10S; L15V; K30S; N31S; Y32W; F33L; R39K; T51A; N53S; E81D; Q90K; G92S; A93S; L96Y; L104V
4	3C12E	M4L; L10S; L15V; K30S; F33L; R39K; A43V; T51A; N53T; E70H; F83V; Q90K; L91C; G92N; A93S; Y94A; L96Y; G100Q; L104V

20 **Métodos para producir proteínas**

Expresión recombinante

25 Tal y como se describe en el presente documento, un ácido nucleico que codifica una proteína que se une a CD83 de la descripción y/o uno o varios polipéptidos de la misma, se introduce en una estructura artificial de expresión, de modo que está ligado funcionalmente a un promotor para facilitar de este modo su expresión. Los métodos para producir estructuras artificiales de expresión, por ejemplo, mediante la clonación en estructuras artificiales/vectores de expresión, son conocidos en la técnica y/o se describen en Ausubel et al., (En: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) y (Sambrook et al., (En: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, tercera edición 2001) y el documento US7270969.

30 En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 de la descripción se expresa en una célula bacteriana. Promotores típicos adecuados para la expresión en células bacterianas tales como, por ejemplo, una célula bacteriana

seleccionada a partir del grupo que comprende *E. coli*, *Staphylococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Salmonella sp.*, *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.*, incluyen, pero no se limitan a, un promotor tal como lacZ, lpp, promotores L o R sensibles a la temperatura, promotores T7, T3, SP6 o semia artificiales tales como el promotor tac inducible con IPTG o el promotor lacUV5.

5 En otro ejemplo, la proteína que se une a CD83 se expresa en una célula de levadura. Promotores típicos adecuados para la expresión en células de levadura tales como, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. pombe* incluyen, pero no se limitan a, promotores procedentes de los siguientes genes ADH1, GAL1, GAL4, CUP1, PHO5, nmt, RPR1 o TEF1.

10 En otro ejemplo, la proteína que se une a CD83 se expresa en una célula de insecto. Los promotores típicos adecuados para la expresión en células de insecto, o en insectos, incluyen, pero no se limitan a, el promotor OPEI2, el promotor de actina de insecto aislado a partir de *Bombyx mori*, el promotor dsh de *Drosophila sp.* (Marsh et al., Hum. Mol. Genet. 9: 13-25, 2000).

15 Una proteína que se une a CD83 de la descripción también se puede expresar en células vegetales. Los promotores para expresar péptidos en células vegetales son conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, el promotor del gen de la amilasa de *Hordeum vulgare*, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, el promotor del gen de la nopalina sintasa (NOS) y los promotores P1 y P2 vegetales inducibles con auxina.

20 En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la descripción se expresa en una célula de mamífero o en un mamífero. Los promotores típicos adecuados para la expresión en una célula de mamífero incluyen, por ejemplo, un promotor seleccionado a partir del grupo que consiste en elementos LTR retrovirales, el promotor temprano de SV40, el promotor tardío de SV40, el promotor IE de CMV (inmediato temprano de citomegalovirus), el promotor EF1 (procedente del factor de elongación 1 humano), el promotor EM7, el promotor UbC (procedente de la ubiquitina C humana). Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles, incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células HEK-293); las células de riñón de hámster recién nacido (BHK); las células de ovario de hámster chino (CHO); las células de riñón de mono verde africano (VERO-76); o las células de mieloma (por ejemplo, células NS/0).

25 Las células ejemplares usadas para expresar una proteína que se une a CD83 de la descripción son células CHO, células de mieloma o células HEK. La célula puede comprender además una o varias mutaciones genéticas y/o deleciones que facilitan la expresión de un anticuerpo modificado genéticamente. Un ejemplo no limitante es una deleción de un gen que codifica una enzima requerida para la fucosilación de una inmunoglobulina o un anticuerpo expresado. Por ejemplo, el gen delecionado codifica FUT8. Una fuente comercialmente disponible de células CHO con FUT8 delecionado es Biowa (células Potelligent™). Por ejemplo, las células utilizadas para la expresión de una inmunoglobulina o un anticuerpo defucosilado son células CHO con FUT8 delecionado, tal como las células Potelligent™ de Biowa.

30 Otros elementos de estructuras artificiales/vectores de expresión son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, potenciadores, terminadores transcripcionales, secuencias de poliadenilación, ácidos nucleicos que codifican marcadores seleccionables o detectables y orígenes de replicación.

35 En un ejemplo, una estructura artificial de expresión es una estructura artificial de expresión bicistrónica. Por "bicistrónica" se entiende una sola molécula de ácido nucleico que es capaz de codificar dos polipéptidos distintos a partir de regiones diferentes del ácido nucleico, por ejemplo, un solo ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido que contiene una  $V_H$  y un polipéptido que contiene una  $V_L$  como polipéptidos distintos. Generalmente, las regiones que codifican cada polipéptido distinto están separadas por un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) y la región 5' del IRES no comprende una secuencia de terminación de la transcripción. Se describen ejemplos de IRESs, por ejemplo, en el documento US20090247455.

40 Después de la producción de una estructura artificial de expresión adecuada, esta se introduce en una célula adecuada usando cualquier método conocido en la técnica. Los métodos ejemplares incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas tal como el uso de lipofectamina (Gibco, MD, EE.UU.) y/o celfectina (Gibco, MD, EE.UU.), captación de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo de micropartículas, tal como con el uso de tungsteno recubierto con ADN o partículas de oro (Agracetus Inc., WI, EE.UU.), entre otros.

45 Las células utilizadas para producir las proteínas que se unen a CD83 de esta descripción se cultivan a continuación en condiciones conocidas en la técnica para producir la proteína que se une a CD83 de la descripción.

La presente descripción también contempla sistemas de expresión exentos de células, por ejemplo, los sistemas TNT T7 y TNT T3 (Promega), los vectores pEXP1-DEST y pEXP2-DEST (Invitrogen).

#### Purificación de proteínas

55 Después de la producción/expresión, una proteína que se une a CD83 de la descripción se purifica usando un método conocido en la técnica. Tal purificación proporciona la proteína de la descripción sustancialmente exenta de

proteínas inespecíficas, ácidos, lípidos, carbohidratos y similares. En un ejemplo, la proteína estará en una preparación en la que más de aproximadamente el 90% (por ejemplo, 95%, 98% o 99%) de la proteína en la preparación es una proteína de la descripción que se une a CD83.

5 Se emplean métodos convencionales de purificación de péptidos para obtener una proteína que se une a CD83 aislada de la descripción, que incluyen, pero no se limitan a diversos protocolos de cromatografía líquida (HPLC) de alta presión (o rendimiento) y de aislamiento de polipéptidos sin HPLC, tales como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía por intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de modo mixto, métodos de separación de fase, separaciones electroforéticas, métodos de precipitación, métodos de salinización/precipitación salina, inmunocromatografía y/u otros métodos.

10 En un ejemplo, la purificación por afinidad es útil para aislar una proteína de fusión que comprende un marcador. Los métodos para aislar una proteína usando la cromatografía por afinidad se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Scopes (en: Protein purification: principles and practice, tercera edición, Springer Verlag, 1994). Por ejemplo, un anticuerpo o un compuesto que se une al marcador (en el caso de un marcador de polihistidina, este puede ser, por ejemplo, níquel-NTA) se inmoviliza sobre un soporte sólido. Una muestra que comprende una  
15 proteína se pone en contacto después con el anticuerpo o el compuesto inmovilizado durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca la unión. Después del lavado para eliminar cualquier proteína no unida o unida no específicamente, la proteína se eluye.

En el caso de una proteína que se une a CD83 que comprende una región Fc de un anticuerpo, se puede usar proteína A o proteína G o formas modificadas genéticamente de las mismas, para la purificación por afinidad. La  
20 proteína A es útil para aislar proteínas purificadas que comprenden una región Fc de la cadena pesada  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  o  $\gamma 4$  humana. La proteína G se recomienda para todos los isotipos de Fc de ratón y para  $\gamma 3$  humana.

#### Conjugados

En un ejemplo, una proteína que se une a CD83 de la presente descripción se conjuga con un compuesto. Por ejemplo, el compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste en un radioisótopo, un marcador detectable, un  
25 compuesto terapéutico, un coloide, una toxina, un ácido nucleico, un péptido, una proteína, un compuesto que aumenta la semivida de la proteína que se une a CD83 en un sujeto y mezclas de los mismos.

El compuesto puede unirse directa o indirectamente a la proteína que se une a CD83 (por ejemplo, puede comprender un enlazador en el caso de una unión indirecta). Los ejemplos de compuestos incluyen, un radioisótopo (por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111), un marcador detectable (por ejemplo, un fluoróforo o un nanocristal  
30 fluorescente), un compuesto terapéutico (por ejemplo, un agente quimioterapéutico o antiinflamatorio), un coloide (por ejemplo, oro), una toxina (por ejemplo, ricina o toxoide tetánico), un ácido nucleico, un péptido (por ejemplo, un péptido que se une a la albúmina sérica), una proteína (por ejemplo, una proteína que comprende un dominio que se une a antígeno de un anticuerpo o albúmina sérica), un compuesto que aumenta la semivida de la proteína que se une a CD83 en un sujeto (por ejemplo, polietilenglicol u otro polímero soluble en agua que tenga esa actividad) y  
35 mezclas de los mismos. Los compuestos ejemplares que se pueden conjugar con una proteína que se une a CD83 de la descripción y los métodos para esa conjugación se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento US2010221262.

Algunos compuestos ejemplares que se pueden conjugar con una proteína que se une a CD83 de la presente descripción se incluyen en la Tabla 3.

40 Tabla 3: Compuestos útiles en la conjugación.

Grupo	Detalle
Radioisótopos (ya sea directa o indirectamente)	• $^{123}\text{I}$ , $^{125}\text{I}$ , $^{130}\text{I}$ , $^{133}\text{I}$ , $^{135}\text{I}$ , $^{47}\text{Sc}$ , $^{72}\text{As}$ , $^{72}\text{Sc}$ , $^{90}\text{Y}$ , $^{88}\text{Y}$ , $^{97}\text{Ru}$ , $^{100}\text{Pd}$ , $^{101\text{m}}\text{Rh}$ , $^{101\text{m}}\text{Rh}$ , $^{119}\text{Sb}$ , $^{128}\text{Ba}$ , $^{197}\text{Hg}$ , $^{211}\text{At}$ , $^{212}\text{Bi}$ , $^{153}\text{Sm}$ , $^{169}\text{Eu}$ , $^{212}\text{Pb}$ , $^{109}\text{Pd}$ , $^{111}\text{In}$ , $^{67}\text{Cu}$ , $^{68}\text{Cu}$ , $^{67}\text{Cu}$ , $^{75}\text{Br}$ , $^{76}\text{Br}$ , $^{77}\text{Br}$ , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , $^{11}\text{C}$ , $^{13}\text{N}$ , $^{15}\text{O}$ , $^{18}\text{I}$ , $^{188}\text{Rc}$ , $^{203}\text{Pb}$ , $^{64}\text{Cu}$ , $^{105}\text{Rh}$ , $^{198}\text{Au}$ , $^{199}\text{Ag}$ o $^{177}\text{Lu}$
Extensores de la semivida	• Polietilenglicol • Glicerol • Glucosa
Sondas fluorescentes	• Ficoeritrina (PE) • Alociocianina (APC) • Alexa Fluor 488 • Cy5.5

Productos biológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proteínas fluorescentes como la luciferasa de Renilla, GFP</li> <li>• moduladores inmunes, como las citocinas</li> <li>• toxinas</li> <li>• una inmunoglobulina o un anticuerpo o una región variable de anticuerpo</li> <li>• extensores de la semivida, como albúmina o regiones variables de anticuerpos o péptidos que se unen a la albúmina</li> </ul>
Agentes quimioterapéuticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taxol</li> <li>• 5-FU</li> <li>• Doxorrubicina</li> <li>• Idarrubicina</li> </ul>

Ensayos de escrutinio

Las proteínas que se unen a CD83 de la presente descripción se escrutan fácilmente en busca de actividad biológica, por ejemplo, tal como se describe a continuación.

5 Ensayos de unión

Una forma de ensayo es un ensayo de unión a antígeno, por ejemplo, tal como se describe en Scopes (en: Protein purification: principles and practice, tercera edición, Springer Verlag, 1994). Un método de ese tipo generalmente implica marcar la proteína que se une a CD83 y ponerla en contacto con el antígeno inmovilizado. Después de un lavado para eliminar la proteína unida no específica, se detecta la cantidad de marcador y, como consecuencia, la proteína unida. Por supuesto, la proteína que se une a CD83 se puede inmovilizar y marcar el antígeno. También se pueden emplear ensayos de tipo clasificación, por ejemplo, tal y como se describen o ejemplifican en este documento. Alternativa o adicionalmente, se pueden emplear ensayos de resonancia de plasmón superficial.

En un ejemplo, se realiza un ensayo de unión con un péptido que comprende un epítipo de CD83. De esta manera, se seleccionan proteínas que se unen a CD83 que se unen a una región específica de CD83.

15 Ensayos *in vivo*

Las proteínas que se unen a CD83 de la presente descripción también se pueden evaluar para determinar la eficacia terapéutica en un modelo animal de una afección, por ejemplo, una afección mediada por CD83. Por ejemplo, la proteína que se une a CD83 se administra a un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal o colitis (por ejemplo, colitis inducida por sulfato de sodio dextrano (DSS) o un modelo de colitis por transferencia adoptiva de CD45Rb (por ejemplo, Kanai et al., *Inflamm. Bowel Dis.* 12: 89-99 2006). En otro ejemplo, se administra una proteína que se une a CD83 a un modelo de esclerosis múltiple, por ejemplo, modelos de EAE en los que se inmuniza un ratón o una rata con una proteína de la cubierta de mielina o un péptido derivado de la misma (por ejemplo, MOG, MBP o PLP) y se genera de este modo una respuesta inmune contra la proteína, lo que induce un modelo de esclerosis múltiple. Se revisan modelos ejemplares de EAE en, por ejemplo Tsunoda y Fujinami, *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 55: 673-686, 1996. La proteína que se une a CD83 se puede someter a ensayo también o alternativamente en un modelo de artritis, por ejemplo, una cepa de SKG en ratón (Sakaguchi et al., *Nature* 426: 454-460, 1995), un modelo de artritis con colágeno de tipo II en rata, un modelo de artritis con colágeno de tipo II en ratón o modelos de artritis inducida por antígeno (Bendele J. *Musculoskel. Neuron. Interact.* 1: 377-385 2001) y/o un modelo de enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias (por ejemplo, estimulada con OVA o estimulada con antígeno de cucaracha).

La eficacia terapéutica de una proteína que se une a CD83 de la presente descripción se puede evaluar también o alternativamente en un modelo de respuesta de injerto contra hospedador, por ejemplo, en el que los esplenocitos de un animal se inyectan en un animal alogénico (por ejemplo, un animal con MHC o HLA no compatible). En un ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) se trasplantan a un modelo de ratón SCID xenogénico a través de, por ejemplo, una inyección intraperitoneal después de una radiación corporal total subletal que induce una respuesta fatal de hospedador contra injerto mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos, que requiere DCs humanas. El tratamiento con una proteína que se une a CD83 de la descripción se puede administrar a ratones, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal el día del trasplante de las PBMCs (día 0) y se puntúan los ratones según las manifestaciones clínicas de GVHD.

Ensayos de unión competitiva

Los ensayos para determinar una proteína que se une a CD83 que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de la descripción serán evidentes para el experto en la materia. Por ejemplo, el anticuerpo de la descripción se conjuga con un marcador detectable, por ejemplo, un marcador fluorescente o un marcador radiactivo. El anticuerpo marcado y la proteína que se une a CD83 de la prueba se mezclan después y se ponen en contacto con CD83 o un péptido que comprende un epítipo de la misma. Después se determina el nivel de anticuerpo marcado y se compara con el nivel determinado cuando el anticuerpo marcado se pone en contacto con CD83 o el péptido que comprende un epítipo de la misma en ausencia de la proteína que se une a CD83. Si el nivel

de anticuerpo marcado se reduce en presencia de la proteína que se une a CD83, en comparación con la ausencia de proteína que se une a CD83, la proteína que se une a CD83 inhibe competitivamente la unión del anticuerpo.

Opcionalmente, la proteína que se une a CD83 se conjuga con un marcador diferente del anticuerpo. Esto permite la detección del nivel de unión a CD83 de la proteína que se une a CD83 o del péptido portador del epítipo.

- 5 En otro ejemplo, se permite que la proteína que se une a CD83 se una a CD83 o a un péptido que comprende un epítipo de la misma antes de poner en contacto CD83 o el péptido con un anticuerpo descrito en este documento. Una reducción en la cantidad de anticuerpo unido en presencia de la proteína que se une a CD83 en comparación con la ausencia de proteína que se une a CD83, indica que la proteína que se une a CD83 inhibe competitivamente la unión del anticuerpo a CD83. También se puede realizar un ensayo recíproco usando la proteína que se une a CD83 marcada y permitiendo primero que el anticuerpo se una a CD83 o al péptido. En ese caso, una cantidad reducida de proteína que se une a CD83 marcada, unida a CD83 o al péptido en presencia del anticuerpo en comparación con la ausencia de anticuerpo, indica que la proteína que se une a CD83 inhibe competitivamente la unión del anticuerpo a CD83.

#### Ensayos de cartografiado de epítipos

- 15 En otro ejemplo, se cartografía el epítipo unido por una proteína descrita en este documento. Los métodos de cartografiado de epítipos serán evidentes para el experto en la materia. Por ejemplo, se produce una serie de péptidos solapantes que incluyen la secuencia de CD83 o una región de la misma que comprende un epítipo de interés, por ejemplo, péptidos que comprenden de 10 a 15 aminoácidos. La proteína que se une a CD83 se pone en contacto a continuación con cada péptido o una combinación de los mismos y se determinan el o los péptidos a los que se une. Esto permite la determinación del o de los péptidos que comprenden el epítipo al que se une la proteína que se une a CD83. Si se unen múltiples péptidos no contiguos a través de la proteína, la proteína se puede unir a un epítipo conformacional.

- 20 Alternativa o adicionalmente, los residuos de aminoácidos dentro de CD83 se mutan, por ejemplo, mediante mutagénesis por barrido de alanina, y se determinan las mutaciones que reducen o evitan la unión a proteínas. Es probable que cualquier mutación que reduzca o evite la unión de la proteína que se une a CD83 esté dentro del epítipo unido a través de la proteína.

- 25 Un método adicional implica unir CD83 o una región de la misma a una proteína que se une a CD83 inmovilizada de la presente descripción y digerir el complejo resultante con proteasas. El péptido que permanece unido a la proteína inmovilizada se aísla a continuación y se analiza, por ejemplo, usando espectrometría de masas, para determinar su secuencia.

- 30 Un método adicional implica convertir hidrógenos en CD83 o una región de la misma en átomos de deuterio y unir la proteína resultante a una proteína que se une a CD83 inmovilizada de la presente descripción. Los átomos de deuterio se convierten después de nuevo en hidrógeno, CD83 o una región de la misma se aísla, se digiere con enzimas y se analiza, por ejemplo, usando espectrometría de masas para identificar aquellas regiones que comprenden deuterio, que estarían protegidas de la conversión a hidrógeno mediante la unión de una proteína que se une a CD83 descrita en el presente documento.

#### Ensayos de la semivida

- 35 Algunas proteínas que se unen a CD83 incluidas en la presente descripción tienen una semivida mejorada, por ejemplo, se modifican para extender su semivida en comparación con las proteínas que se unen a CD83 que no están modificadas genéticamente. Los métodos para determinar una proteína que se une a CD83 con una semivida mejorada serán evidentes para la persona experta. Por ejemplo, se evalúa la capacidad de una proteína que se une a CD83 para unirse a un receptor de Fc neonatal (FcRn). A este respecto, un aumento de la afinidad de la unión hacia FcRn incrementaba la semivida en suero de la proteína que se une a CD83 (véase, por ejemplo, Kim et al., Eur. J. Immunol., 24: 2429, 1994).

- 45 La semivida de una proteína que se une a CD83 de la descripción también se puede medir mediante estudios farmacocinéticos, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito por Kim et al., Eur. J. de Immunol. 24: 542, 1994. De acuerdo con este método, la proteína que se une a CD83 radiomarcada se inyecta por vía intravenosa en ratones y se mide su concentración plasmática periódicamente en función del tiempo, por ejemplo, de 3 minutos a 72 horas después de la inyección. La curva de aclaramiento así obtenida debe ser bifásica, es decir, una fase alfa y una fase beta. Para la determinación de la semivida *in vivo* de la proteína que se une a CD83, se calcula la tasa de aclaramiento en la fase beta y se compara con la de la proteína que se une a CD83 de tipo silvestre o no modificada genéticamente.

#### Ensayos de estabilidad

- 55 La estabilidad de una proteína que se une a CD83 de la descripción se puede evaluar a través de cualquiera entre una variedad de ensayos. Por ejemplo, la proteína que se une a CD83 se expone a una condición, por ejemplo, calor o ácido, o se almacena durante un período de tiempo (por ejemplo, 1 mes) a temperatura ambiente. La agregación

de la proteína que se une a CD83 se puede evaluar determinando la turbidez (en donde un aumento en la turbidez después de la exposición a la condición indica inestabilidad), cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis en gel no reductora o un estudio de la unión o neutralización descrito en este documento.

#### Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

- 5 La proteína que se une a CD83 de la presente descripción o el ácido nucleico que codifica la misma o la célula que expresa la misma (sinónimo de ingrediente activo) es útil para una administración parenteral, tópica, oral o local, con aerosol o una administración transdérmica, para un tratamiento profiláctico o terapéutico.

10 La formulación de una proteína que se une a CD83 o un ácido nucleico que la codifica o una célula que la expresa que se va a administrar, variará según la ruta de administración y la formulación (por ejemplo, solución, emulsión, cápsula) seleccionadas. Una composición farmacéutica apropiada que comprende una proteína que se une a CD83 o un ácido nucleico que la codifica o una célula que la expresa que se va a administrar, se puede preparar en un vehículo fisiológicamente aceptable. También se puede usar una mezcla de proteínas que se unen a CD83. Para las soluciones o emulsiones, los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer de lactato o aceites fijos. Los expertos en la técnica conocen una variedad de vehículos acuosos apropiados, que incluyen agua, agua tamponada, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido), solución de dextrosa y glicina. Los vehículos intravenosos pueden incluir diversos aditivos, conservantes o reponedores de líquidos, nutrientes o electrolitos (véase, en general, Remington's Pharmaceutical Science, 16ª edición, Mack, Ed. 20 1980). Las composiciones pueden contener opcionalmente sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar unas condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste de pH y tamponadores y agentes que ajustan la toxicidad, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y lactato de sodio. La proteína que se une a CD83 de esta descripción se puede liofilizar para el almacenamiento y reconstituir en un vehículo adecuado antes del uso, de acuerdo con métodos de liofilización y reconstitución conocidos en la técnica.

La concentración óptima del o de los ingredientes activos en el medio elegido se puede determinar empíricamente, de acuerdo con procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, y dependerá de la formulación farmacéutica final deseada.

- 30 Los intervalos de dosificación para la administración de la proteína que se une a CD83 de la descripción son los suficientemente elevados como para producir el efecto deseado. Por ejemplo, la composición comprende una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de la proteína que se une a CD83 o del ácido nucleico que codifica la misma o de la célula que expresa la misma.

35 Tal y como se emplea en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se considerará que significa una cantidad suficiente de la proteína que se une a CD83, del ácido nucleico o de las células para inducir/aumentar o inhibir/reducir/prevenir la actividad de CD83 en un sujeto. El experto en la materia sabrá que esa cantidad variará dependiendo, por ejemplo, de la proteína que se une a CD83, del ácido nucleico o de las células y/o del sujeto particular y/o del tipo o la gravedad de una afección que se está tratando. Por consiguiente, esta expresión no debe interpretarse como que limita la descripción a una cantidad específica, por ejemplo, un peso o una cantidad de proteínas que se unen a CD83, de ácidos nucleicos o de células.

- 40 Tal y como se emplea en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se considerará que significa una cantidad suficiente de proteína que se une a CD83, de ácido nucleico o de células para reducir o inhibir uno o varios síntomas de una afección.

45 Tal y como se emplea en el presente documento, la expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se considerará que significa una cantidad suficiente de proteína que se une a CD83, de ácido nucleico o de células, para prevenir o inhibir o retrasar la aparición de uno o varios síntomas detectables de una afección.

50 La dosificación no debe ser tan elevada como para causar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, el estado, el sexo y el grado de la enfermedad en el paciente y puede ser determinada por un experto en la materia. La dosificación puede ser ajustada por cada médico en caso de cualquier complicación. La dosificación puede variar desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, por ejemplo, desde aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, tal como, desde aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o varias administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días.

En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 se administra por vía subcutánea o intravenosa.

- 55 En algunos ejemplos, la proteína que se une a CD83 u otro ingrediente activo se administra con una dosis inicial (o carga) que es mayor que la posterior (dosis de mantenimiento). Por ejemplo, la molécula de unión se administra con una dosis inicial de entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg. La molécula de unión se administra después con una dosis de mantenimiento de entre aproximadamente 0,0001 mg/kg y aproximadamente 1

mg/kg. Las dosis de mantenimiento se pueden administrar desde cada 7 a 35 días, tal como cada 14 o 21 o 28 días.

En algunos ejemplos, se emplea un régimen de incremento de dosis, en el que una proteína que se une a CD83 u otro ingrediente activo se administra inicialmente con una dosis más baja que la utilizada en las dosis posteriores. Este régimen de dosificación es útil en el caso de que el sujeto sufra inicialmente eventos adversos

- 5 En el caso de un sujeto que no responde adecuadamente al tratamiento, se pueden administrar múltiples dosis en una semana. Alternativa o adicionalmente, se pueden administrar dosis crecientes.

10 Una o varias proteínas que se unen a CD83 de la presente descripción se pueden administrar a un individuo a través de una ruta apropiada, sola o en combinación con (antes, simultáneamente o después) otro fármaco o agente. Por ejemplo, la proteína que se une a CD83 de la presente descripción también se puede usar en combinación con proteínas, por ejemplo, un antagonista de TNF, un anticuerpo anti-IL-12/23, un agente antiinflamatorio, un corticoesteroide, metotrexato o un analgésico. La proteína que se une a CD83 de la presente descripción se puede usar como composiciones administradas por separado, administradas junto con antibióticos y/o agentes antimicrobianos.

15 Los expertos en la materia apreciarán que las proteínas que se unen a CD83 de la presente descripción se pueden introducir en un sujeto administrando una estructura artificial de expresión de la descripción o una célula que expresa una proteína que se une a CD83 de la descripción. Se puede usar una variedad de métodos para introducir un ácido nucleico que codifica el anticuerpo en una célula diana *in vivo*. Por ejemplo, el ácido nucleico sin conjugar se puede inyectar en el sitio diana, se puede encapsular en liposomas o se puede introducir por medio de un vector vírico.

20 Ensayos de detección de CD83

Los siguientes ensayos se pueden realizar con una proteína que se une a CD83 de la descripción, por ejemplo, una proteína que se une a CD83 conjugada con un marcador detectable como se describe en este documento. La detección de CD83 con un ensayo descrito en este documento es útil para diagnosticar o pronosticar una afección.

25 Un inmunoensayo es un formato de ensayo ejemplar para diagnosticar una afección en un sujeto o para detectar CD83 en una muestra. La presente descripción contempla cualquier forma de inmunoensayo, que incluye transferencia Western, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayo de inmunoabsorción ligado a fluorescencia (FLISA), ensayo de competencia, radioinmunoensayo, inmunoensayo de flujo lateral, inmunoensayo de flujo continuo, ensayo electroquimioluminiscente, ensayos basados en nefelometría, ensayos de turbidimetría y ensayos basados en la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

30 Una forma de inmunoensayo adecuado es, por ejemplo, un ELISA o FLISA.

35 En una forma, un ensayo de ese tipo implica inmovilizar una proteína que se une a CD83 de la descripción sobre una matriz sólida, tal como, por ejemplo, un micropocillo de poliestireno o policarbonato o una tira reactiva, una membrana o un soporte de vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio). A continuación se pone en contacto directo una muestra de la prueba con la proteína que se une a CD83 y se une o se captura CD83 en la muestra. Después del lavado para eliminar cualquier proteína no unida en la muestra, una proteína que se une a CD83 en un epítipo distinto se pone en contacto directo con la CD83 capturada. Esa proteína detectora generalmente está marcada con una molécula indicadora detectable, como, por ejemplo, una enzima (p. ej., peroxidasa de rábano picante (HRP)), fosfatasa alcalina (AP) o  $\beta$ -galactosidasa) en el caso de un ELISA, o un fluoróforo en el caso de un FLISA. Alternativamente, se puede usar una segunda proteína marcada que se une a la proteína detectora. Después del lavado para eliminar cualquier proteína no unida, la molécula indicadora detectable se detecta mediante la adición de un sustrato en el caso de un ELISA, como, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, TMB o toluidina, o 5-bromo-4-cloro-3-indol-beta-D-galactopiranosido (x-gal). Por supuesto, la proteína inmovilizada (capturada) y la proteína detectora, se pueden usar de forma opuesta.

45 El nivel de antígeno en la muestra se determina después usando una curva estándar que se ha producido usando cantidades conocidas del marcador o mediante una comparación con una muestra de control.

Los ensayos descritos anteriormente se modifican fácilmente para usar quimioluminiscencia o electroquimioluminiscencia como base para la detección.

50 Como será evidente para el experto en la materia, otros métodos de detección basados en un ensayo de inmunoabsorción son útiles en el desempeño de la presente descripción. Por ejemplo, un método de inmunoabsorción basado en la descripción *supra* usando un radiomarcador para la detección, o un marcador de oro (por ejemplo, oro coloidal) para la detección, o un liposoma, por ejemplo, que encapsula NAD<sup>+</sup> para la detección o un ensayo de inmunoabsorción ligado a acridinio.

55 En algunos ejemplos de la descripción, el nivel de CD83 se determina usando un detector de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, BIAcore™, GE Healthcare, Piscataway, N.J.), un dispositivo de flujo continuo, por ejemplo, tal como se describe en el documento US7205159, un dispositivo de microinmunoensayo o nanoimunoensayo (por

ejemplo, tal como se describe en el documento US7271007), un dispositivo de flujo lateral (por ejemplo, tal como se describe en el documento US20040228761 o US20040265926), un inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA, por ejemplo, tal como se describe en el documento US4593089 o US4751190) o un ensayo inmunturbidimétrico (p. ej., tal como se describe en el documento US5571728 o US6248597).

5 **Afecciones o enfermedades**

Las proteínas que se unen a CD83 de la descripción se pueden usar para el tratamiento, prevención, diagnóstico o profilaxis de una afección o enfermedad asociada a CD83.

Las afecciones o enfermedades ejemplares que se pueden tratar, prevenir, diagnosticar o pronosticar realizando un método de la descripción incluyen afecciones o enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

10 Las afecciones y enfermedades ejemplares incluyen alergias, asma, rechazo del injerto, afecciones autoinmunes como miastenia grave, esclerosis múltiple, vasculitis, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas como Morbus Crohn o colitis ulcerosa, autoinmunopatía asociada a HLA B27 como Morbus Bechterew y lupus eritematoso sistémico, enfermedades de la piel como psoriasis, artritis reumatoide, diabetes mellitus insulino dependiente y SIDA.

15 En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 de la descripción agota las células inmunes tales como las células presentadoras de antígeno (APCs) (por ejemplo, células dendríticas (DCs)) y/o linfocitos (por ejemplo, linfocitos T) para modular respuestas inmunes aberrantes o no deseadas, por ejemplo, en afecciones o enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. En un ejemplo, la proteína que se une a CD83 es un anticuerpo que se une específicamente a la superficie de una APC y/o un linfocito y agota la APC y/o el linfocito a través de una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). En un ejemplo, la ADCC está mediada por  
20 linfocitos citolíticos naturales (NK).

Rechazo del injerto

En un ejemplo, las proteínas que se unen a CD83 de la descripción se pueden usar para agotar células inmunes tales como APCs y/o linfocitos, para modular las respuestas inmunes asociadas, por ejemplo, con el rechazo de un  
25 injerto, por ejemplo, la enfermedad de injerto contra hospedador o la enfermedad de hospedador contra injerto. En un ejemplo, el injerto es un órgano o un tejido o un injerto celular. En un ejemplo, el injerto es un aloinjerto. En un ejemplo, el injerto es un injerto de células madre hematopoyéticas.

La enfermedad de injerto contra hospedador se puede producir cuando un injerto inmunocompetente, por ejemplo, un injerto de células madre hematopoyéticas alogénicas, se administra con células inmunes viables y funcionales a un receptor, por ejemplo, un receptor histoincompatible, y las células inmunes presentes en el injerto, por ejemplo,  
30 los linfocitos T, atacan los tejidos del receptor del trasplante.

La enfermedad del hospedador contra el injerto se puede producir cuando las APCs del donante o del receptor presentan antígenos obtenidos a partir del injerto alogénico a las células inmunes del receptor, por ejemplo, linfocitos T, que a su vez se activan para convertirse en células inmunes efectoras, por ejemplo, linfocitos T citotóxicos (CTLs) que a continuación atacan al trasplante.

35 Un "injerto alogénico" es un injerto procedente de un donante genéticamente no idéntico (por ejemplo, un donante histo-incompatible) de la misma especie.

*Trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH)*

Un "trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH)" es un injerto que comprende células madre hematopoyéticas multipotentes que se pueden obtener, por ejemplo, a partir de la médula ósea o la sangre periférica. El trasplante puede incluir algunas células que no son madre, por ejemplo, APCs que incluyen DCs y/o  
40 linfocitos.

Las "células madre hematopoyéticas" pueden autorrenovarse y diferenciarse para dar lugar a todos los tipos de células sanguíneas, incluidas las mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas), eritroides (eritrocitos), megacariocíticas (plaquetas) y linajes linfoides (linfocitos T, linfocitos B, células  
45 NK). A lo largo de la diferenciación, la célula madre hematopoyética primero pierde su capacidad de autorrenovación, luego pierde el potencial de estirpe paso a paso, a medida que pasa a convertirse en una célula efectora madura. Típicamente, una célula humana Lin<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup> es una célula madre hematopoyética. En un ejemplo, la expresión de CD34 se usa para identificar células madre hematopoyéticas en sangre periférica aislada a partir de donantes humanos.

50 El TCMH se puede emplear en el tratamiento de enfermedades y afecciones que requieren trasplantes de células madre. Por ejemplo, las células madre se pueden usar para el tratamiento de un fallo o una disfunción en la producción y la maduración de células sanguíneas normales, neoplasia hematopoyética, enfermedad autoinmune, enfermedad hepática o inmunodeficiencia (por ejemplo, por motivo de una radiación, quimioterapia o infección con un agente patógeno).

Las células madre se pueden expandir o diferenciar *ex vivo* antes de la administración a un sujeto.

- 5 El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas se puede usar para tratar una o varias de las siguientes afecciones: leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, trastornos mieloproliferativos, síndromes mielodisplásicos, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, anemia aplásica, aplasia pura de glóbulos rojos, hemoglobinuria paroxística nocturna, anemia de Fanconi, talasemia grave, anemia falciforme, inmunodeficiencia combinada grave (SCID), síndrome de Wiskott-Aldrich, linfocitosis hemofagocítica (HLH), errores innatos del metabolismo (p. ej., mucopolisacaridosis), enfermedad de Gaucher, leucodistrofias metacromáticas y adrenoleucodistrofias).

Kits

- 10 También se describe en este documento un kit que comprende uno o varios de los siguientes:

- (i) una proteína que se une a CD83 de la descripción o estructura(s) artificial(es) de expresión que la codifican;
- (ii) una célula de la descripción; o
- (iii) una composición farmacéutica de la descripción.

- 15 En el caso de un kit para detectar CD83, el kit puede comprender adicionalmente un medio de detección, por ejemplo, ligado a una proteína que se une a CD83 de la descripción.

En el caso de un kit para uso terapéutico/profiláctico, el kit puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Opcionalmente, el kit se empaqueta con instrucciones de uso en un método descrito en este documento de acuerdo con cualquier ejemplo.

- 20 La presente descripción incluye los siguientes Ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 Materiales y métodos

#### Diseño de vectores de expresión

- 25 Los vectores mAbXpress se ensamblaron usando secuencias de la cadena pesada de la región constante humana (subtipos IgG1 e IgG4) y de la cadena ligera  $\kappa$  disponibles públicamente. El ADN requerido se sintetizó y se optimizaron los codones para la expresión en mamíferos mediante Geneart AG (Alemania). Estos casetes se colocaron después en vectores de expresión de mamífero que contenían secuencias para una expresión, selección y amplificación en células de mamíferos (Acyte Biotech, Australia). Un solo sitio *SacI* se incluyó en el vector de expresión para facilitar la linealización y la clonación In Fusion™ (ClonTech) de la región variable.

- 30 Clasificación de la presentación en fagos contra CD83 y clonación In Fusion™ independiente de la ligación de los scFvs

- El dominio extracelular de CD83 humana se expresó en células CHO y se purificó mediante IMAC. Esta preparación se utilizó para aislar aglutinantes a partir de un banco de presentación en fagos de scFv humano publicado (Sheets et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95(11): 6157-62, 1998). Se aislaron varios aglutinantes únicos para CD83 recombinante y se seleccionó el clon 3C12 para la clonación y expresión. Las regiones variables para la cadena pesada y la ligera se amplificaron con PCR a partir de los vectores fagémidos usando cebadores para las regiones estructurales 5' y 3' de cada cadena. Se incluyeron 15 pb adicionales en cada cebador, correspondientes a las bases aguas arriba y aguas abajo del vector de destino para permitir la clonación In Fusion™ independiente de la ligación (Clontech). Los cebadores a modo de ejemplo para la cadena pesada eran: 3C12\_VhFor 5'-CAGGTGTCCACTCGGAGGTGCAGCTGCAGGAG-3' (SEQ ID NO: 50) y 3C12\_VhRev 5'-GCGGAGGACACGGTGAGCGTGGTCCCTTGCC-3' (SEQ ID NO:51), y para la cadena ligera los cebadores eran: 3C12\_VkFor 5'-CCGGCGTGCAGTCCGAGATCGTGATGACCCAG-3' (SEQ ID NO:52) y 3C12\_VkRev 5'-GCCACGGTCCGCTTGAGTTCCAGCTTGGTCCC-3' (SEQ ID NO:53). Las regiones subrayadas representan la secuencia específica de scFv, que varía de un clon a otro. Los productos de la PCR no purificados se insertaron en los vectores mAbXpress de la cadena pesada IgG1 y ligera  $\kappa$  usando el sistema In Fusion™ (Clontech), según las instrucciones del fabricante. La transfección y la purificación de los anticuerpos se realizaron como se describe a continuación.

#### Expresión en células de mamífero

- 50 Para la expresión de los anticuerpos, los plásmidos mAbXpress que hospedaban las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera se cotransfectaron usando Polietilenimina (PEI)-Max preparada en agua (Polysciences Inc). Los complejos de la transfección se prepararon en una proporción de PEI:ADN de 3,5:1. Las transfecciones

transitorias de CHO adaptadas a la suspensión se realizaron utilizando una proporción de 0,75:0,25 v/v de células : complejo de transfección, lo que significa que cada 750  $\mu\text{L}$  de células (a  $1,5 \times 10^6$  células· $\text{mL}^{-1}$ ) en medio CD-CHO se transfecta con 1,6  $\mu\text{g}$  de ADN y 5,6  $\mu\text{g}$  de PEI en 250  $\mu\text{l}$  de medio OptiPro SFM (Invitrogen). El complejo se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente sin interrupción antes de la adición a la suspensión celular. A las 4 horas de la transfección, las células se diluyeron duplicando el volumen total con CD-CHO y factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) a  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , antes de transferir los cultivos a incubadoras humidificadas a  $32^\circ\text{C}$  y 7,5% de  $\text{CO}_2$  durante 7-14 días con agitación (160-250 rpm, dependiendo del recipiente y la relación de agitación del agitador). Los estudios de la expresión se realizaron normalmente a pequeña escala (2 ml), mediana (30 ml) o elevada (400 ml). Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación y el anticuerpo secretado se purificó con cromatografía de proteína A.

#### Purificación con proteína A de inmunoglobulinas y proteínas de fusión de Ig

Una columna HiTrap de 1 ml con proteína A (GE Healthcare) se lavó con una bomba con 20 volúmenes de columna (VC) de PBS. El material sobrenadante que contenía IgG1 humana o la proteína de fusión CD83-Fc, en un intervalo de volúmenes de 20 ml - 1,2 l, se aplicó con un caudal de 1 ml por minuto. La columna se lavó con 20-50 VC de PBS antes de aplicar 10 VC de tampón de elución con proteína A con cada fracción de 1 ml eluida en 40  $\mu\text{l}$  de tampón de neutralización para restablecer el pH a 7,0.

#### Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica de los anticuerpos expresados en mAbXpress

Para la SEC, se utilizó una columna TSK-GEL G3000SWx1 de 30 cm x 7,8 mm (Tosoh Bioscience) en un LC Agilent serie 1200 con una fase móvil de fosfato 100 mM pH 6,7, NaCl 200 mM, filtrada a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . El caudal era de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . La calibración se realizó utilizando patrones de filtración en gel (Bio-Rad). Los rendimientos típicos de los experimentos de transfección transitoria que utilizaban este sistema oscilaban entre 20 y 60  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### Transferencia Western de CD83

Para evaluar si los mAbs anti-CD83 reconocen epítomos lineales o conformacionales, se preparó la proteína recombinante hCD83<sub>ECD</sub>-His para SDS-PAGE. Muestras no desnaturalizadas (es decir, no desnaturalizadas por ebullición en mercaptoetanol) que contenían 5  $\mu\text{g}$  de hCD83<sub>ECD</sub>-His cargaron directamente en los pocillos, mientras que las muestras desnaturalizadas incluían  $\beta$ -mercaptoetanol al 2,5% y se calentaron a  $95^\circ\text{C}$  durante 10 minutos antes de cargarlas. Las proteínas se separaron en geles NuPAGE al 12% (Invitrogen) que se aplicó a 200 voltios durante 50 minutos antes de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa durante 45 minutos a 100 voltios, usando el Sistema Transblot (BioRad). Se aplicó el tampón de bloqueo Odyssey (Li-Cor Biosciences) durante 1 hora antes de la adición del anticuerpo primario. El anticuerpo primario estaba compuesto por 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IgG 3C12 o una dilución 1:2.000 de reactivo anti-CD83 humana, HB15e-PE, cada uno preparado en PBS con Tween-20 al 0,5% (PBST) durante 1 hora. Después de lavar dos veces con PBST, se aplicó un anticuerpo IRD800 infrarrojo anti-Fc humano o de ratón (Li-Cor) con una dilución de 1:10.000 durante 45 minutos, antes del lavado y la visualización en el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (Li-Cor).

#### Cuantificación de CD83 en la membrana celular

El número de moléculas de CD83 en la superficie celular presentes en líneas celulares y DCs de la sangre procedentes de PBMCs humanas, se estimó utilizando el protocolo estándar QIFIKIT (Dako) (Serke S et al., Cytometry 33(2): 179-87, 1998). En el caso de líneas celulares y células transfectadas,  $0,5 \times 10^6$  células se tiñeron con 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de mAb anti-CD83 sin conjugador, HB15a (Immunotech) durante 45 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y una dilución 1:50 del kit proporcionó IgG anti-ratón-FITC o IgG anti-ratón-PE (Chemicon). Para la cuantificación de los niveles de CD83 en las DCs activadas,  $1 \times 10^6$  PBMCs se cultivaron durante la noche para regular al alza CD83 (Zhou et al., J. Immunol. 154(8): 3821-35, 1995). Las células se tiñeron después con 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de HB15a seguido de una detección como se ha indicado anteriormente. Para bloquear cualquier FITC anti-ratón restante sin unir, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de suero de ratón al 10% y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Se añadió una mezcla de estirpe que consistía en anticuerpos CD3, CD14, CD19, CD20 y CD56 conjugados con PE y aplicados según las recomendaciones del fabricante, junto con HLA-DR-*apc*-Cy7 y 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de CMRF-44 biotinilado, posteriormente detectado con una dilución 1:50 de estreptavidina-azul Pacific. Las células se lavaron entre cada etapa con 2 ml de tampón MACS y se centrifugaron a  $1000 \times g$  durante 2 minutos, tal como se describe a continuación. Las DCs humanas activadas se seleccionaron como la estirpe-HLA-DR<sup>+</sup>CMRF-44<sup>+</sup>HB15a<sup>+</sup>. Se preparó una curva estándar para estimar las densidades de C83 en la superficie tal y como se describe en el protocolo proporcionado por QIFIKIT.

#### Citometría de flujo

Las células para el análisis de citometría de flujo se lavaron en tampón frío de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) compuesto por albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA; Invitrogen) con EDTA 2 mM en PBS pH 7,2, o tampón de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) que contenía FCS al 0,5%, azida de sodio al 0,05% (Ajax Finechem) en PBS. Las células lavadas se contaron y  $2 \times 10^5$  -  $2 \times 10^6$  células se distribuyeron en tubos de fondo redondo de poliestireno de 5 ml (BD Biosciences). Todas las etapas que implicaban

una centrifugación de los sedimentos celulares se realizaron en una centrífuga DiaCent-12 Benchtop (DiaMed) a 1000 x g durante 2 minutos. Las células se tiñeron durante 30-60 minutos sobre hielo a menos que se indicara lo contrario en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con conjugados fluorescentes de anticuerpo primario o secundario. Las células se lavaron con 3 mL de tampón FACS o MACS y se sedimentaron. Esta etapa se repitió para procedimientos de tinción en etapas múltiples. Las células se analizaron o bien hasta 3 horas después a la finalización de la tinción o se fijaron mediante la aplicación de 200  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído al 1% (PFA) durante 30 minutos, antes de lavar y resuspender en 200  $\mu\text{L}$  de tampón FACS. En los casos en los que se evaluaron células muertas mediante tinción con 7-AAD, las células se dejaron sobre hielo un máximo de 2 horas antes del análisis. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo de 4 colores FACS Calibur usando el programa informático CellQuest para adquirir datos, o un sistema de citometría de flujo LSRII usando el programa informático FACSDiva Versión 6.1 (todos de BD Biosciences). El análisis de datos se realizó con el programa informático FlowJo Versión 8.8.6 o FCS Express 3 (DeNovo Software).

#### Conjugación química de un mAb con R-Ficoeritrina (RPE)

3C12 purificado o un mAb de control de isotipo IgG1 humano, Herceptina (60  $\mu\text{g}$ ) en PBS se acoplaron covalentemente a 100  $\mu\text{g}$  de RPE con conjugación de anticuerpos y RPE Lynx Rapid (AbD Serotec) según las instrucciones del fabricante. Antes del uso en experimentos de citometría de flujo, el anticuerpo se tituló de 0,5-50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , determinando 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  como una concentración de trabajo óptima para teñir CD83 en las células KM-H2.

#### Preparación de IgG desfucosilada

El anticuerpo no fucosilado se obtuvo añadiendo 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de kifunensina (GlycoFineChem, Nueva Zelanda) a células CHO transfectadas según el protocolo convencional descrito anteriormente, aproximadamente 4-6 horas después de la adición del complejo de transformación. Los cultivos se recogieron después de 6-7 días de cultivo estándar y se purificaron usando cromatografía por afinidad con proteína A como se ha descrito anteriormente. Para validar el contenido en oligosacárido asociado con anticuerpo, la proteína purificada se concentró hasta 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  utilizando un dispositivo de filtración centrífuga Ultra-4 (Amicon) en una centrífuga de ángulo fijo según las instrucciones del fabricante. Una muestra de 50  $\mu\text{L}$  se redujo con 2-mercaptoetanol al 0,25% en bicarbonato de amonio 50 mM, SDS al 0,25% a 100°C durante 20 minutos. Se añadió Triton-X-100 al 0,5% para formar el complejo con SDS y posteriormente se añadió 1 U de N-glucosidasa F (Roche). Las muestras se digirieron durante 4 minutos en un microondas con tecnología inverter antes de la dilución y acidificación con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5%, y se purificaron mediante cromatografía de extracción en fase sólida (SPE) con carbón grafitado. Las muestras purificadas se liofilizaron, se resuspendieron en NaCl 50 mM y se analizaron en ácido súper-2,5-dihidroxibenzoico (sDHB; Sigma) matriz MALDI-MS en un modelo de reflectrón positivo en el Bruker Ultraflex. Posteriormente se realizó una validación de la IgG desfucosilada mediante espectrometría de masas.

#### Construcción de un banco de $V_L$ mezclas aleatoriamente para la maduración por afinidad

El ADN de la cadena pesada (VH) de scFv 3C12 se amplificó a partir del vector fagémido pHEN1 (Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 19(15): 4133-7, 1991) con 2,5 U de polimerasa de Pfu de alta fidelidad (Stratagene) utilizando el protocolo proporcionado por el kit, y los cebadores con sitios de restricción (subrayados) y las secuencias adicionales en 5' que se solapaban con el vector para permitir la clonación Gap Repair (Orr-Weaver y Szostack, 1983; Gietz y Schiestl 1991):

3C12VH5' 5'-

GACTATGCAGCTAGCGGTGCCATGGCAGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG-3'

(SEQ ID NO:54)

Mod3C12VH3' 5'-

GTTGAGCCTCCGGACTTAAGGTCGACTGAGGACACGGTGAGCGTGGTCC-3'

40 (SEQ ID NO:55)

con una concentración final de 0,5  $\mu\text{M}$ . El banco mezclado aleatoriamente de 3C12- $V_L$  se construyó usando recombinación homóloga *in vivo*, basada en un método descrito previamente (Zhou et al., J. Mol. Biol. 404(1): 88-99, 2010) con la siguiente modificación. Brevemente, se emplearon 10  $\mu\text{g}$  de ADN de un fragmento de  $V_H$  de 3C12 purificado del gel (GeneClean Turbo, Qbiogene) en una transformación convencional con acetato de litio de células de levadura EBY100 (cartografiado de epítomos de anticuerpos que emplea la presentación en levadura (García-Rodríguez C, Zhou Y, Marks JD, compiladores, 2010), Springer) junto con 50  $\mu\text{g}$  de vector pYD4 digerido con *NcoI-SalI* que contenía un banco de aproximadamente  $10^7$  secuencias de genes de  $V_L$  humana. El banco de levadura transformado se cultivó en 500 mL de medio mínimo de levadura, medio de crecimiento selectivo de ácido de casamino y dextrosa (SD-CAA), tal como se define en otra parte (cartografiado de epítomos de anticuerpos usando presentación en levadura (García-Rodríguez C, Zhou Y, Marks JD, compiladores, 2010), Springer). Las condiciones del cultivo eran de 30°C con agitación a 250 rpm, a menos que se indicara lo contrario. El tamaño del banco se estimó colocando en placas de SD-CAA diluciones en serie de levadura transformada. A las 48 horas de la

transformación, una muestra que representaba un exceso de diez veces de la diversidad máxima del banco (es decir,  $10^8$ ), se indujo en medio de crecimiento selectivo de ácido de casamino y galactosa (SG-CAA) a  $18^\circ\text{C}$  durante 48 horas.

#### Clasificación del banco mezclado aleatoriamente de $V_L$ mediante presentación en levaduras usando FACS

5 El banco mezclado aleatoriamente de  $V_L$  de 3C12 presentado fue sometido a tres rondas de clasificación celular. Cada ronda implicaba la incubación con hCD83ECD-His soluble durante 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . La concentración de antígeno utilizada para la unión a los clones de anticuerpos presentados en las diversas rondas de selección era de 20 nM, 2,5 nM y 0,5 nM de hCD83<sub>ECD</sub>-His diluido en tampón FACS, desde la primera hasta la tercera ronda, respectivamente. La tercera y la última ronda de clasificación también incorporaban una etapa de lavado durante la noche en tampón FACS después de una tinción con antígeno hCD83ECD-His para seleccionar los clones con tasas de disociación más lentas. La unión al antígeno se detectó en cada etapa de selección usando un anticuerpo anti-CD83 (o bien  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de anticuerpo monoclonal de ratón, mB4 o  $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de anticuerpo policlonal, RA83) capturado mediante una dilución 1:500, respectivamente, de FITC específico de anti-Fc de IgG1 de ratón o FITC específico de anti-Fc de conejo (ambos Jackson Immunoresearch). La expresión de scFv en la superficie de la levadura se evaluó durante cada ronda usando un anti-SV5-Alexa 647. Células diluidas hasta  $1\text{-}5\times 10^7$  células·mL<sup>-1</sup> en tampón FACS frío, se analizaron en un instrumento FACSAriaII (BD Biosciences) y se clasificaron en las selecciones de recogida P2 y P3, tal como se muestra en la Figura 6A. Los resultados de las selecciones de recogida se cultivaron a  $1\times 10^4$ - $1\times 10^5$  células·mL<sup>-1</sup> en medio líquido SD-CAA (cartografiado de epítopos de anticuerpos usando presentación en levadura (García-Rodríguez C, Zhou Y, Marks JD, compiladores, 2010), Springer) durante 48 horas antes de inducir la presentación en superficie con medio líquido SG-CAA que contenía galactosa (cartografiado de epítopos de anticuerpos usando presentación en levadura (García-Rodríguez C, Zhou Y, Marks JD, compiladores, 2010), Springer) para la siguiente ronda de clasificación. El resultado de los clones clasificados de la tercera ronda se extendió en placas SD-CAA. Se cultivaron un total de 90 clones individuales en SD-CAA durante la noche antes de la inducción en medio SG-CAA durante otras 18 horas. Los scFvs presentados en levadura amplificados se tiñeron con hCD83<sub>ECD</sub>-His 0,2 nM y se compararon con scFv 3C12 de tipo silvestre presentado en levadura. A partir de este análisis FACS, se seleccionaron 20 clones individuales con aumentos evidentes de la intensidad de la unión al antígeno, para una secuenciación. La secuenciación del ADN reveló cuatro secuencias dominantes de la cadena  $V_L$  (3C12.B, 3C12.C, 3C12.D y 3C12.E), que se reformatearon como IgG1k humana (vectores mAbXpress, ACYTE Biotech) como se ha descrito anteriormente.

#### Generación de transfectantes estables con niveles variables de expresión de CD83

El ADNc de longitud completa (nº de orden de Genbank NM\_004233.3) se clonó en un vector de expresión bicistrónico de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)-proteína fluorescente verde (GFP), pMXIE.2. Se usó ADN plasmídico (10  $\mu\text{g}$ ) para transfectar células confluentes de empaquetamiento retroviral GP+E86 en un matraz T25 usando lipofectamina (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Cuando las células de empaquetamiento GP+E86 transfectadas de forma estable habían alcanzado un 80% de confluencia, las células de empaquetamiento se radiaron con 2000cGy para inhibir la expansión, y se añadieron  $5 \times 10^5$  células·mL<sup>-1</sup> de la línea celular en suspensión BB88 para un cocultivo, junto con  $2\text{-}4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de hexadimetrina (Sigma) como potenciador de la infección vírica. Después de 48 horas de cultivo a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , las células en suspensión BB88 se retiraron y se clasificaron según la expresión de GFP usando un instrumento FACSAriaII. Se realizaron unas rondas de clasificación posteriores, seleccionando transformantes con una expresión mejorada de GFP/CD83. La expresión de CD83 se confirmó mediante tinción por citometría de flujo de las células clasificadas. Los cultivos monoclonales de las células se clonaron mediante dilución limitante.

#### Agotamiento de las células dendríticas activadas con mAb de CD83

45 Las PBMCs crioconservadas se descongelaron y se cultivaron durante la noche en RPMI-10 para inducir una regulación al alza de CD83 (Zhou y Tedder, J. Immunol. 154(8): 3821-35, 1995). Se cultivaron las células hasta  $2\times 10^6$  células·mL<sup>-1</sup> en un volumen final de 1 ml en tubos FACS de 5 ml con tapa estéril (BD Biosciences) en presencia de  $6.000\ \text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IL-2 recombinante (Boehringer Mannheim) para activar las células NK y o bien  $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IgG 3C12.C o control de isotipo de IgG1k humana. Las células se incubaron durante 3-4 días antes de la tinción por citometría de flujo y el análisis para evaluar la población de DCs activadas.

#### Ratón SCID xenogénico, modelo de GVHD

55 Todo el trabajo con animales fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Queensland. Se obtuvieron ratones SCID de cinco semanas de edad a partir del Centro de Recursos Animales (Australia Occidental) y se alojaron en condiciones exentas de agentes patógenos durante una semana antes del trabajo experimental. El modelo xenogénico utilizado se ha descrito previamente (Wilson et al., J. Exp. Med. 206(2): 387-98, 2009). Brevemente, los ratones condicionados el Día -1 con radiación de 325cGy se dosificaron con anticuerpo contra asialoGM1 (ASGM-1), que agota las células NK y otros leucocitos para facilitar el prendimiento de una inyección intraperitoneal de  $50\times 10^6$  PBMCs humanas el Día 0. Los tratamientos con anticuerpos se administraron a los ratones, también mediante inyección intraperitoneal, el día del trasplante de PBMCs (Día 0) con la dosis especificada en las leyendas de las figuras. Los ratones recibieron puntuaciones diarias en un intervalo métrico desde

0,0 (saludable) a 2,0 (mal estado) con incrementos mínimos de 0,5 para cada manifestación clínica de GVHD durante 30 días después del trasplante, sin conocimiento del grupo de tratamiento para eliminar el sesgo. Los criterios de la puntuación eran pérdida de peso, postura, actividad, textura del pelaje, integridad de la piel y los ojos y diarrea. Los animales que obtuvieron una puntuación de 2,0 para cualquier criterio o que poseían una puntuación acumulativa >5,0, fueron sacrificados mediante dislocación cervical. De los animales que sobrevivieron después del día 20, se recogieron lavados del bazo, médula ósea y cavidad peritoneal y se evaluó la tinción mediante citometría de flujo con anticuerpos anti-CD45 humanos y de ratón para confirmar la presencia de células humanas prendidas. Las comparaciones de las curvas de supervivencia se realizaron en GraphPad Prism Versión 5.01 utilizando la prueba Log-rank (Mantel-Cox).

#### 10 Preparación de Fab y análisis de la afinidad

Los fragmentos Fab se generaron mediante digestión con papaína con el kit de preparación Pierce Fab MicroFab, según las instrucciones del fabricante, excepto que la resina de proteína A proporcionada por el kit se reemplazó por resina MAbSelect SuRE (Seldon et al., J. Biomol. Tech. 22: 50-2, 2011). Los Fab se diluyeron en tampón HBS-EP que consistía en Hepes 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM y polisorbato 20 al 0,005% (GE Healthcare). Se evaluó la afinidad de los Fab diluidos utilizando un instrumento BiaCore3000 (GE Healthcare) equipado con un chip CM5 acoplado con 100 Unidades de Resonancia (UR) de proteína hCD83ECD-His, utilizando el protocolo del asistente de Análisis Cinético. Las tasas cinéticas se estimaron usando el programa informático BiaEvaluation (GE Healthcare) usando el modelo de enlace incorporado 1:1 con limitaciones de transferencia de masa.

#### Células

20 Las líneas celulares de linfoma, KM-H2 y L428, y las líneas celulares susceptibles de transfección, que incluían las líneas celulares en suspensión de ovario de hámster chino (CHO-S) y las líneas celulares de ratón BB88 y FDCP1 se obtuvieron a partir de las existencias del Instituto de Investigación Mater Medica. Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se obtuvieron a partir de voluntarios sanos que donaron sangre o productos de aféresis, según lo recogido de acuerdo con el Comité de Ética de Investigación Humana de Mater Health Services.

25 Todas las muestras de donantes sanos humanos se examinaron para detectar virus de inmunodeficiencia humana, hepatitis B y C, virus linfotrópico T humano y sífilis.

#### Medios de cultivo celular y soluciones

Las líneas celulares humanas y PBMCs humanas se cultivaron en medio Roswell Part Memorial Institute (RPMI) complementado con 1x penicilina-estreptomicina, GlutaMAX 2 mM, HEPES 25 mM y suero de ternera fetal (FCS) al 10% que había sido termoinactivado a 56°C durante 30 minutos antes de su uso (RPMI-10, todos los componentes de Invitrogen). Las líneas celulares de ratón BB88 y las células FDCP1 se cultivaron en medio Eagle modificado con Dulbecco (Invitrogen) complementado con penicilina-estreptomicina, GlutaMAX, HEPES y FCS al 10% (DMEM-10). Las células FDCP1 transfectadas con CD83 humana de longitud completa se cultivaron adicionalmente en presencia de 100 µg·mL<sup>-1</sup> del antibiótico selectivo Geneticina de G418. Todas las células se cultivaron a 37°C en una incubadora humidificada, 5% de CO<sub>2</sub> y con pases según correspondiera.

#### Preparación en Ficoll de PBMCs a partir de sangre periférica y productos de aféresis

La centrifugación en gradiente de densidad se utilizó en la purificación de las PBMCs a partir de productos sanguíneos. Brevemente, una muestra de 400 ml de sangre periférica se diluyó 1:1 con PBS estéril a temperatura ambiente, mientras que los productos de la aféresis concentrados se diluyeron 1:20 con PBS. En tubos estériles de 50 ml, se colocaron 35 ml de producto sanguíneo diluido con 15 ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) antes de la centrifugación a 600 x g durante 20 minutos con el freno de la centrifuga desactivado. Usando una pipeta Pasteur, se recogieron las células en la interfaz de Ficoll y se lavaron 3-5 veces con PBS para eliminar las plaquetas contaminantes. Las células se contaron usando un hemocitómetro y se cultivaron, se crioconservaron o se usaron en ensayos funcionales.

#### 45 Crioconservación y reactivación de células de mamífero

Las PBMCs se prepararon para la crioconservación mediante centrifugación a 300 x g durante 5 minutos y se resuspendieron hasta tener una densidad final de 50x10<sup>6</sup> células·mL<sup>-1</sup> en una solución compuesta por dimetilsulfóxido al 10% (DMSO; Sigma) y FCS al 90%. Todas las demás células se resuspendieron normalmente en una solución que contenía DMSO al 8%, medio condicionado al 50% y medios de nuevo aporte al 42%. Las células se dividieron en partes alícuotas en crioviales estériles de 1 ml, se colocaron en recipientes de congelación Cryo a 1°C (Nalgene) y se transfirieron inmediatamente a un almacenamiento temporal a -80°C con reubicación en un almacenamiento de nitrógeno líquido (-196°C) al cabo de 24-48 horas. Según se requirió, las células se descongelaron en un baño de agua a 37°C y se diluyeron inmediatamente en 15 ml de medio precalentado. Las células se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en 10 ml de medio para un uso adicional o cultivo.

Generación de linfocitos citolíticos activados por linfocina (LAK)

Las PBMCs de nuevo aporte o descongeladas ( $< 2 \times 10^9$  células) se lavaron y se resuspendieron en tampón MACS frío compuesto por albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA; Invitrogen) con EDTA 2 mM en PBS pH 7,2. Se añadieron microperlas de CD56 humano según las recomendaciones del fabricante y las células se seleccionaron positivamente en un separador VarioMACS equipado con una columna LS (todo de Miltenyi). Para confirmar la pureza de las células NK, las fracciones positivas y negativas se tiñeron con un conjugado de anticuerpo fluorescente CD56 (BD Biosciences) y se analizaron por citometría de flujo. Las células LAK se cultivaron en presencia de  $6000 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  de IL-2 humana (Boehringer Mannheim) a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  durante 2-7 días. Las células se recogieron mediante incubación durante 30 minutos sobre hielo antes de la eliminación del material sobrenadante, seguido de 30 minutos sobre hielo en PBS frío que contenía EDTA al 2%; todas las células recogidas se lavaron dos veces antes de la adición antes de resuspender en RPMI-10.

Ensayo de liberación de cromo

Para determinar la capacidad de los mAbs para provocar ADCC con células efectoras LAK, se realizaron ensayos de liberación de cromo usando la línea celular KM-H2 o las líneas celulares BB88 transfectadas de manera estable con CD83 humana como dianas marcadas con cromo. Se marcó un máximo de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  con  $100 \mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  en tampón TD durante 45 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  con agitación suave cada 10 minutos. Las células se lavaron dos veces con RPMI-10. Las células efectoras LAK y  $1-5 \times 10^3$  células diana marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en V (Nunc) en una relación Efectora : Diana (E : D) especificada en las leyendas de la Figura. Los tratamientos con anticuerpos se añadieron como se especifica. Para el bloqueo de los experimentos, se añadieron  $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de clon 3G8 anti-CD16 humano no conjugado o control de isotipo IgG1k de ratón hasta tener un volumen final de  $150 \mu\text{L}$ . Se prepararon pocillos adicionales que contenían células diana en RPMI-10 (es decir, liberación espontánea) o 1,67% de Triton-X-100 (liberación total). Cada condición se ejecutó con cinco réplicas. Las células extendidas en las placas se incubaron durante 4 horas antes de centrifugar a  $300 \times g$  durante 5 minutos a temperatura ambiente. El material sobrenadante ( $50 \mu\text{L}$ ) de cada pocillo se mezcló con  $150 \mu\text{L}$  de OptiPhase "SuperMix" y se analizó para determinar las cuentas por minuto (cpm) de  $^{51}\text{Cr}$  con un contador de centelleo Trilux 1450-MicroBeta (ambos de Wallac). La lisis celular específica se calculó utilizando la fórmula estándar: % de lisis =  $[(\text{cpm de la muestra del ensayo} - \text{cpm espontáneas}) / (\text{cpm totales} - \text{cpm espontáneas}) * 100]$ . Se utilizó el programa informático GraphPad Prism Versión 5.01 para representar gráficamente los datos y el error estándar de la media.

Reacción mixta de linfocitos (MLR)

Se descongelaron PBMCs crioconservadas procedentes de dos donantes humanos y se añadieron  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de DNasal (Roche) para prevenir la agregación celular. Para una MLR de una vía, las células de un donante seleccionado para servir como el "estimulador" de MLR, se radiaron con  $3000 \text{ cGy}$ . Las células estimuladoras ( $1 \times 10^5$  células) se añadieron a una cantidad equivalente de las células "respondedoras" no radiadas en placas con fondo en U de 96 pocillos (Nunc), junto con el anticuerpo que se iba a analizar en un volumen final de  $180 \mu\text{L}$  con cinco réplicas por cada condición. Para una MLR de dos vías, las células procedentes de ambos donantes no están radiadas y participan en la activación alogénica. Después de cuatro días de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , se añadió  $1 \mu\text{Ci}$  de timidina tritiada (Perkin Elmer) en un volumen de  $20 \mu\text{L}$ . Las células se incubaron durante 16 horas más y después se transfirieron a una estera filtrante usando FilterMate Harvester (PerkinElmer). Las esteras filtrantes se secaron completamente antes de aplicar  $5 \text{ ml}$  de Betaplate Scint (Wallac) y la lectura con el contador Trilux 1450 Microbeta. Los datos brutos se estandarizaron frente a los pocillos de control de anticuerpos nulos y se indicaron como el porcentaje de proliferación máxima.

Ejemplo 2 Generación y caracterización del mAb 3C12

Se obtuvo un clon de fago scFv mediante la bioclasificación de un gran banco de genes de inmunoglobulina scFv sin manipular humana (Sheets et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95(11): 6157-62, 1998) mediante tres rondas de selección frente a hCD83<sub>ECD</sub>-His recombinante. Usando cebadores que se unen a la región estructural flanqueante semiconservada para cada región variable, y que también contienen el solapamiento de vector requerido, este clon se amplificó por PCR y se clonó en los vectores mAbXpress usando el sistema In Fusion™. El mAb de IgG1 reformateado se expresó en células CHO, seguido de una purificación basada en proteína A. El análisis mediante SDS-PAGE y SEC (Figura 1) mostraba que la molécula se expresaba bien en ese sistema de expresión transitoria, sin observar degradación ni agregación. El anticuerpo reformateado demostró una unión específica a CD83 de la superficie celular expresada por la línea celular obtenida a partir de linfoma de Hodgkin humano, KM-H2 (Figura 2).

El scFv anti-CD83 se reformateó como IgG1  $\kappa$  específicamente para proporcionar una respuesta de tipo ADCC. Para mostrar que el anticuerpo resultante era funcional, se usó un anticuerpo anti-CD83 recombinante purificado (es decir, mAb 3C12) en la citometría de flujo para demostrar la unión a líneas celulares humanas CD83<sup>+</sup> y células transfectadas con hCD83 (Figura 2A). Además, en un ensayo funcional de liberación de cromo, el mAb 3C12 inducía una citólisis significativa de las células KM-H2 en presencia de células efectoras de tipo linfocitos citolíticos naturales (NK) activadas (Figura 2B). Sin embargo, esta lisis inducida por el anticuerpo finalizaba tras el bloqueo de FcγRIIIa (CD16) con el mAb anti-CD16, 3G8, lo que demuestra la necesidad de CD16 en el mecanismo de acción *in vitro* de

3C12 en el ensayo de liberación de cromo.

#### Ejemplo 3 Caracterización del mAb anti-CD83, 3C12

El mAb anti-CD83 humano, 3C12, se caracterizó para evaluar la afinidad y la especificidad de la unión (Tabla 4). 3C12 se une a la línea celular CD83<sup>+</sup>, KM-H2 e inhibe la estimulación de linfocitos T alogénicos en una MLR.

5

Tabla 4: Afinidad y especificidad de la unión para 3C12

Origen del banco de scFv parental Reactividad del Péptido <sub>AA61-78</sub> de hCD83	Ser humano sin manipular -
Afinidad de Fab con BiaCore K <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) K <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> ) K <sub>D</sub> (M)	9,5x10 <sup>5</sup> 1,2x10 <sup>-1</sup> 1,3x30 <sup>-7</sup>

10

15

20

En condiciones no reductoras, 3C12 detecta CD83<sub>ECD</sub>-His humano recombinante en una transferencia Western, sin embargo, la unión de 3C12 se anula cuando CD83 se desnatura mediante calor y reducción de los enlaces de disulfuro. Esta observación también es válida para el anticuerpo comercial HB15e (Figura 3A). En consecuencia, tanto 3C12 como HB15e parecen unirse a epítopos conformacionales que son destruidos mediante calor y reducción de los enlaces de disulfuro. Para determinar si los mAbs de CD83 se unían de manera competitiva o independiente de otros reactivos anti-CD83, se conjugó la IgG 3C12 con RPE y se sometió a ensayo de manera competitiva con anticuerpos comerciales conjugados con FITC, HB15a y HB15e, y el anticuerpo policlonal RA83 detectado con anti-Ig de conejo. El bloqueo competitivo con 3C12 era evidente tras la adición simultánea de los anticuerpos, al observarse una inhibición completa de la unión de HB15e y una inhibición parcial de HB15a y de RA83 en presencia de 3C12 (tabla insertada en la Figura 3). Esto indica que el epítipo 3C12 se comparte o se solapa con el de otros anticuerpos. En las condiciones examinadas, la unión de 3C12 se alteraba mínimamente mediante la adición de cualquiera de los reactivos anti-CD83, observándose solo una disminución marginal en la señal de 3C12 en la competencia con RA83. Este hallazgo demuestra que el anticuerpo 3C12 compite con otros reactivos anti-CD83 en la unión con el antígeno y que el epítipo 3C12 es similar al de los anticuerpos obtenidos a partir de enfoques tradicionales para la generación de anticuerpos.

#### Ejemplo 4 Evaluación *in vivo* del mAb 3C12

25

30

35

Para evaluar la capacidad del mAb 3C12 para prevenir la GVHD *in vivo*, el anticuerpo se administró a ratones SCID que recibieron un trasplante xenogénico de PBMCs humanas. La dosificación del anticuerpo 3C12 se varió tres veces por encima y por debajo de la dosis óptima de 0,125 mg, previamente determinada para el anticuerpo policlonal de conejo RA83 (Wilson et al., Med. 206(2): 387-98, 2009). Como se había observado para RA83, la administración de 0,125 mg de 3C12 mejora significativamente la supervivencia en el modelo xenogénico de GVHD, en relación con su control de isotipo (Figura 4A). El aumento de la dosis de IgG 3C12 a 0,375 mg dio lugar a una disminución de la eficacia del tratamiento, aunque esa tendencia no era significativa. En comparación con la dosis estándar de 0,125 mg de anticuerpo policlonal RA83 de conejo, que producía un 61% de supervivencia, la IgG 3C12 en la dosis equivalente era menos potente, protegiendo al 39% de los ratones de perecer por GVHD (Figura 4B). El aumento de la dosis de RA83 a 1 mg dio como resultado una supervivencia del 100%, pero el mismo aumento con el anticuerpo 3C12 anulaba la eficacia del anticuerpo monoclonal (Figura 4C). Un tratamiento conjunto de los animales con la dosis estándar (0,125 mg) de RA83 con 1 mg de IgG 3C12 también era ineficaz. Esto indica que el efecto de RA83 estaba inhibido por la presencia de una dosis alta de 3C12. Como las dosis estándar y más baja de 3C12 eran eficaces, pero menos potentes que RA83 *in vivo*, el anticuerpo 3C12 se sometió a una modificación genética adicional del anticuerpo para mejorar la potencia del mAb.

#### Ejemplo 5 Glicosilación de un mAb de CD83

40

45

Para producir un anticuerpo afucosilado con el fin de mejorar el potencial de ADCC, se añadió kifunensina, un potente inhibidor de la glicosidasa, durante la transfección de las células CHO con ADNc que codificaba 3C12. La Figura 5 demuestra que la presencia de kifunensina durante la transfección bloquea eficazmente la adición de fucosa del anticuerpo 3C12 (es decir, 3C12.Kif), según lo evaluado por espectrometría de masas. Los glicanos liberados a partir de la muestra 3C12.Kif mediante digestión con N-glicosidasa F producían una señal predominante a aproximadamente 1905 m/z, correspondiente a GlcNAc2Man9, tal y como se esperaba si no hay procesamiento de glicanos con alto contenido en manosa. También había señales más bajas a 1742 m/z y 1580 m/z correspondientes a GlcNAc2Man8 y GlcNAc2Man7, respectivamente. En comparación, 3C12 de tipo silvestre produce una señal dominante a 1485 m/z, correspondiente a los carbohidratos que contienen fucosa. La glicosilación se realizó sin alterar de manera perceptible el peso molecular, la especificidad y la afinidad funcional de 3C12 de tipo silvestre (Figura 5B, C).

Ejemplo 6 Modificación de la afinidad de un mAb de CD83 mediante mezcla aleatoria de las cadenas ligeras

Una maduración por afinidad mediante la mezcla aleatoria de las cadenas ligeras se utilizó para mejorar la fuerza de la interacción antígeno-anticuerpo como una estrategia para mejorar la funcionalidad. En este caso, la secuencia de ADN de la V<sub>H</sub> de 3C12 se clonó en un banco de ADNc de secuencias de V<sub>L</sub> humanas, y el banco resultante de aproximadamente 10<sup>7</sup> emparejamientos únicos de V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> se presentaba en la superficie de las células de levadura para permitir selecciones dirigidas por la afinidad. A nivel de proteína, muchos de estos emparejamientos son perjudiciales para la capacidad de 3C12 para unirse al antígeno CD83, ya que <1% de los scFv presentados seguía siendo positivo para la unión al antígeno en la primera ronda de clasificación de levaduras (Figura 6A). Los clones con una afinidad mejorada hacia el antígeno CD83 recombinante, se seleccionaron mediante enriquecimiento de la levadura, presentando scFv que se unían fuertemente a hCD83<sub>ECD</sub>-His en relación con el nivel de expresión de scFv en la superficie de la levadura, determinado mediante una detección de la intensidad de la fluorescencia de un marcador de SV5 expresado en el extremo C-terminal de cada scFv. La selección de los clones de scFv mediante este método produjo cuatro nuevas variantes de scFv de 3C12 con distintas secuencias de VL y propiedades de unión mejoradas en relación con el scFv de tipo silvestre (Figura 6B, C).

Se estimó que los mAbs 3C12 madurados por afinidad, reformateados en IgG1 humana completa, cuando se preparaban como aglutinantes de Fab usando digestión con papaína, tenían mejoras de la afinidad de 3-20 veces con respecto al tipo silvestre (3C12.WT), según lo determinado por Biacore SPR (Tabla 5). Las mayores mejoras en la unión de anticuerpos son atribuibles a tasas de disociación cinética más lentas, con clones que mostraban mejoras de 8 a 15 veces respecto a la koff observada. La tasa de asociación de los anticuerpos permanecía similar a la de 3C12 de tipo silvestre (K<sub>on</sub> = 9,0 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>), en donde la mayoría de los clones mostraba mejoras <1,4 veces y un clon (3C12.B) tenía una reducción de aproximadamente 3 veces en la tasa de asociación (K<sub>on</sub> = 3,2 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). En términos de mejora de la afinidad general, la variante 3C12.C tenía la mayor afinidad observada hacia CD83 (KD = 6,1 x 10<sup>-9</sup> M) incluyendo la mejor (es decir, la más lenta) tasa de disociación (K<sub>off</sub> = 7,8 x 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) y se caracterizó adicionalmente. La Figura 7A destaca gráficamente esas mejoras de la unión de 3C12.C con respecto a 3C12.WT, ya que se logra una mayor intensidad de la señal de la unión (es decir, UR) usando concentraciones reducidas de la variante mezclada aleatoriamente de V<sub>L</sub> durante la fase de asociación dependiente K<sub>off</sub> y K<sub>on</sub>. De manera similar, se observa una tasa de disociación más lenta para el Fab 3C12.C durante la fase de disociación dependiente K<sub>off</sub>. Como molécula de IgG completa, la afinidad mejorada de IgG 3C12.C también demostró una unión superior a las células KM-H2 en relación con la IgG 3C12.WT (Figura 7B).

Tabla 5: Afinidad de 3C12 de tipo silvestre (3C12.WT) y fragmentos Fab de variantes mezclados aleatoriamente de V<sub>L</sub>

Clon	K <sub>on</sub> de Fab (1/Ms)	K <sub>off</sub> de Fab (1/s)	K <sub>D</sub> de Fab (M)
3C12.WT	9,0x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>-1</sup>	1,3x10 <sup>-7</sup>
3C12.B	3,2x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>-1</sup>	4,3x10 <sup>-8</sup>
3C12.C	1,3x10 <sup>6</sup>	7,8x10 <sup>-3</sup>	6,1x10 <sup>-9</sup>
3C12.D	1,1x10 <sup>6</sup>	2,7x10 <sup>-2</sup>	2,5x10 <sup>-8</sup>
3C12.E	1,2x10 <sup>6</sup>	5,0x10 <sup>-2</sup>	4,2x10 <sup>-8</sup>

Ejemplo 7: Variantes de 3C12 modificadas por afinidad y glicomodificadas mejoran la eficacia *in vitro*

Las mejoras de la actividad funcional de 3C12.kif glicomodificado y los anticuerpos 3C12.C mejorados por afinidad se evaluaron mediante un ensayo de ADCC y en una MLR. Tanto 3C12.C como 3C12.Kif producen una ADCC máxima mediada por NK >10% mayor en un ensayo de liberación de cromo, y tenían una potencia >25 veces mayor que 3C12.WT (Figura 8A). Asimismo, la proliferación celular como resultado de una estimulación alogénica en una MLR se inhibía con IgG 3C12.C y 3C12.Kif con una potencia >5 veces mayor que con 3C12.WT (Figura 8B). Se observó una actividad superior para 3C12.C, lo que demostraba una potencia comparable a la del anticuerpo policlonal, RA83.

Ejemplo 8 Mecanismos de acción *in vitro* en un mAb anti-CD83 modificado genéticamente

Para determinar el efecto del mAb anti-CD83 sobre las DCs de sangre primaria, se aplicó el anticuerpo 3C12.C a PBMC cultivadas en presencia de IL-2 para activar las células NK. Las células cultivadas en presencia de IgG 3C12.C tenían porcentajes reducidos de DCs activadas (58%), en comparación con las células sin tratamiento o con control de isotipo (>80%), según lo evaluado con los marcadores de activación CMRF-44 y CD83 (detectados mediante 3C12.C no conjugado y anti-Fc humano-FITC secundario, en lugar de 3C12.C conjugado con FITC, para eliminar de este modo el potencial de cualquier reducción en la intensidad de la señal de detección, debido a una competencia con el anticuerpo del tratamiento; Figura 9). Además, la población de DCs que expresaban CD83<sup>bright</sup> presente en los controles sin tratar y tratados con isotipo, estaba ausente después del tratamiento con 3C12.C, mientras que solo se observaron poblaciones de DCs CD83<sup>dim</sup>. Para determinar si el nivel de expresión de CD83 en la superficie celular es un factor que contribuye a la capacidad de 3C12.C para inducir ADCC, se usaron células BB88 transfectadas de manera estable con niveles variables de expresión de CD83. El número de moléculas de

5 CD83 en esas células y otras líneas celulares que expresaban CD83, se cuantificó usando un ensayo de citometría de flujo con inmunofluorescencia indirecta, que mostraba que los transfectantes BB88 se expresaban a partir de 5.400 moléculas por célula (MPC) hasta <2.300 MPC de antígeno CD83 (Tabla 6). Por lo tanto, los transfectantes poseen niveles mucho más bajos de CD83 en comparación con los niveles de expresión en líneas celulares inmortalizadas y DCs de sangre primaria (10.000-50.000 MPC). Cada una de las líneas celulares BB88 transfectadas con CD83 se lisaron específicamente mediante variantes de 3C12 modificadas genéticamente, lo que demuestra que solo se requieren niveles bajos de CD83 en la superficie celular para activar una ADCC. Además, el grado de la lisis inducida por las variantes de mAb 3C12 es sensible al número de moléculas de CD83 expresadas en la superficie celular. Esto se ejemplifica en la Figura 10, en donde el aumento de la densidad de antígeno de <2.300 a 3.600 y 5.400 se correlacionaba con un aumento de la lisis específica de 5-25 veces.

Tabla 6: Cuantificación con QIFIKit de la densidad del antígeno CD83

Tipo de célula	Moléculas de CD83 por célula (MPC)	Réplicas independientes
BB88-CD83-TF.5K	5.400	2
BB88-CD83-TF.3K	3.600	1
BB88-CD83-TF.2K	<2.300*	2
KM-H2	55.000	6
Raji	49.000	1
L428	11.000	1
DC <sup>bright**</sup> de sangre activada	49.000	2
DC <sup>mid**</sup> de sangre activada	20.000	1
DC <sup>dim**</sup> de sangre activada	<2.300	1

\* Por debajo de los límites de los estándares del kit QIFI

TF = células transfectadas

\*\* Véase el Apéndice 6 para la selección

Ejemplo 9 mAb anti-CD83 madurado por afinidad, 3C12.C es eficaz en un modelo de GVHD xenogénico

15 Para evaluar el mAb 3C12.C mejorado por afinidad para prevenir la GVHD *in vivo*, la variante de 3C12 de V<sub>L</sub> mezcladas aleatoriamente se administró con la dosis estándar de 0,125 mg a ratones SCID condicionados, trasplantados con PBMC humanas. En comparación con el reactivo policlonal RA83 que protegía al 45% (5/11) de los ratones, la IgG 3C12.C demostró una potencia equivalente, previniendo la GVHD en el 54% (6/11) de los ratones, y una potencia mayor que la de 3C12.WT que tenía un 27% (4/15) de supervivencia (Figura 11). La eficacia de todas las cohortes se muestra reducida en comparación con los hallazgos anteriores (Wilson et al., J. Exp. Med. 206(2): 387-98. 2009) ya que RA83 y 3C12.WT normalmente proporcionan >60% y 40% de supervivencia respectivamente. Bajo esas condiciones experimentales, solo 3C12.C era significativamente diferente al control de isotipo.

**Listado de secuencias**

25 <110> Transbio Ltd La Universidad de Queensland Universidad de California

<120> ANTICUERPOS ANTI-CD83 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 514630

30 <150> US 61/759,780

<151> 2013-02-01

<160> 55

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada

ES 2 762 622 T3

<400> 1  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 2  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> secuencia CDR

<400> 2  
 Ser Tyr Ala Met His  
 1 5

15 <210> 3  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia CDR

<400> 3  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr  
 1 5 10

25 <210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> secuencia CDR

35 <400> 4  
 His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5

ES 2 762 622 T3

<210> 5  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera

<400> 5  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

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

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

10

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Gly Ala Tyr Pro Leu  
 85 90 95

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

15

<210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera

20

<400> 6  
 Glu Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Ile Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

ES 2 762 622 T3

<210> 7  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera  
  
 10 <400> 7  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
 20 25 30  
  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
  
 Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
  
 Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu His Pro  
 65 70 75 80  
  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Asp Arg Phe Pro Tyr  
 85 90 95  
  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys  
 100 105  
  
 15 <210> 8  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera  
  
 <400> 8

ES 2 762 622 T3

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Leu Ser Ser Tyr Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys  
100 105

<210> 9  
<211> 107  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Región variable de la cadena ligera

<400> 9  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Cys Asn Ser Ala Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys  
100 105

<210> 10  
15 <211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> secuencia de consenso

- 5 <220>  
<221> X  
<222> (2)..(2)  
<223> I o V
- 10 <220>  
<221> X  
<222> (3)..(3)  
<223> V o Q
- 15 <220>  
<221> X  
<222> (4)..(4)  
<223> M o L
- 20 <220>  
<221> X  
<222> (10)..(10)  
<223> L o F o S
- 25 <220>  
<221> X  
<222> (15)..(15)  
<223> L o I o V
- 30 <220>  
<221> X  
<222> (20)..(20)  
<223> T o S
- 35 <220>  
<221> X  
<222> (25)..(25)  
<223> A o T
- 40 <220>  
<221> X  
<222> (30)..(30)  
<223> K o S o R
- 45 <220>  
<221> X  
<222> (31)..(31)  
<223> N o S
- 50 <220>  
<221> X  
<222> (32)..(32)  
<223> Y o H o W
- 55 <220>  
<221> X  
<222> (33)..(33)  
<223> F o L
- 60 <220>  
<221> X  
<222> (39)..(39)  
<223> R o K
- 65 <220>  
<221> X  
<222> (43)..(43)  
<223> A o V

<220>  
<221> X  
<222> (51)..(51)  
<223> T o A  
5  
<220>  
<221> X  
<222> (53)..(53)  
<223> N o S o T  
10  
<220>  
<221> X  
<222> (66)..(66)  
<223> G o R  
15  
<220>  
<221> X  
<222> (70)..(70)  
<223> E o D o H  
20  
<220>  
<221> X  
<222> (79).. (79)  
<223> Q o H  
25  
<220>  
<221> X  
<222> (81)..(81)  
<223> E o D  
30  
<220>  
<221> X  
<222> (83)..(83)  
<223> F o l o V  
35  
<220>  
<221> X  
<222> (90)..(90)  
<223> Q o K  
40  
<220>  
<221> X  
<222> (91)..(91)  
<223> L o V o C  
45  
<220>  
<221> X  
<222> (92)..(92)  
<223> G o N o D o S  
50  
<220>  
<221> X  
<222> (93)..(93)  
<223> A o S o R  
55  
<220>  
<221> X  
<222> (94)..(94)  
<223> Y o F o A  
60  
<220>  
<221> X  
<222> (96)..(96)  
<223> L o Y  
65  
<220>

ES 2 762 622 T3

<221> X  
 <222> (100)..(100)  
 <223> G o Q

5 <220>  
 <221> X  
 <222> (103)..(103)  
 <223> K o R

10 <220>  
 <221> X  
 <222> (104)..(104)  
 <223> L o V

15 <400> 10  
 Glu Xaa Xaa Xaa Thr Gln Ser Pro Ser Xaa Leu Ser Ala Ser Xaa Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Xaa Ile Thr Cys Arg Xaa Ser Gln Gly Ile Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30  
 Xaa Ala Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Xaa Ser Xaa Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Xaa Ser Gly Thr Xaa Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Xaa Pro  
 65 70 75 80  
 Xaa Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 11  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia CDR

25 <400> 11  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Lys Asn Tyr Phe Ala  
 1 5 10

30 <210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia CDR

35 <400> 12  
 Ala Thr Ser Asn Leu Gln Ser  
 1 5

40 <210> 13  
 <211> 9

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia CDR  
  
 <400> 13  
 Gln Gln Leu Gly Ala Tyr Pro Leu Thr  
 1 5  
  
 10 <210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Secuencia CDR  
  
 <400> 14  
 Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Asn His Leu Ala  
 1 5 10  
  
 20 <210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Secuencia CDR  
  
 <400> 15  
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 1 5  
  
 30 <210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Secuencia CDR  
  
 <400> 16  
 Gln Gln Val Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5  
  
 45 <210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia CDR  
  
 50 <400> 17  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala  
 1 5 10  
  
 55 <210> 18  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Secuencia CDR

<400> 18  
 Ala Thr Ser Thr Leu Gln Ser  
 1 5

5 <210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia CDR

<400> 19  
 Gln Gln Val Asp Arg Phe Pro Tyr Thr  
 1 5

15 <210> 20  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia CDR

<400> 20  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10

25 <210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia CDR

<400> 21  
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 1 5

35 <210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Secuencia CDR

45 <400> 22  
 Gln Lys Leu Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

50 <210> 23  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Secuencia CDR

<400> 23  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala  
 1 5 10

60 <210> 24  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia CDR  
 5  
 <400> 24  
 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser  
 1 5  
 <210> 25  
 10 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Secuencia CDR  
 <400> 25  
 Gln Lys Cys Asn Ser Ala Pro Tyr Thr  
 1 5  
 20 <210> 26  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (2)..(2)  
 <223> A o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (7)..(7)  
 <223> K o S o R  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> (8)..(8)  
 <223> N o S  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (9)..(9)  
 <223> Y o H o W  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> (10)..(10)  
 <223> F o L  
 <400> 26  
 Arg Xaa Ser Gln Gly Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Ala  
 1 5 10  
 55 <210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Secuencia de consenso

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> T o A  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)  
 <223> N o S o T  
 10  
 <400> 27  
 Ala Xaa Ser Xaa Leu Gln Ser  
 1 5  
 <210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> secuencia de consenso  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Q o K  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> L o V o C  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)  
 <223> G o N o D o S  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(5)  
 <223> A o S o R  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Y o F o A  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Y o L  
 50  
 <400> 28  
 Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr  
 1 5  
 55  
 <210> 29  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Cadena pesada  
 <400> 29

ES 2 762 622 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1                   5                   10                   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20                   25                   30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50                   55                   60

ES 2 762 622 T3

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



ES 2 762 622 T3

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Gly Ala Tyr Pro Leu  
85 90 95

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

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 31

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera

10

<400> 31

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

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

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

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

ES 2 762 622 T3

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

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

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

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 32

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena *bright*

10

<400> 32

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

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

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

ES 2 762 622 T3

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu His Pro  
65 70 75 80

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

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

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 33

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera

10

<400> 33

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

ES 2 762 622 T3

35 40 45

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Leu Ser Ser Tyr Pro Tyr  
85 90 95

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

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 34  
<211> 214  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Cadena ligera

<400> 34  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

ES 2 762 622 T3

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Cys Asn Ser Ala Pro Tyr  
 85 90 95

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

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 35  
 <211> 351  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región variable de la cadena pesada

10 <400> 35  
 gaggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggtctggagt ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctatgt attactgtgc gagacactac 300  
 tactacggta tggacgtctg gggccaaggg accacgctca ccgtgtcctc c 351

15 <210> 36  
 <211> 321

ES 2 762 622 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Región variable de la cadena ligera		
	<400> 36		
	gagatcgtga tgaccagtc tccatccctc ctgtctgctt ctttaggaga cagagtcacc	60	
	atcacttgtc gggccagtc gggcattaag aattatcttg cctggtatca gcaaagacca	120	
	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct acatccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca	180	
	cgattcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctga caatcagcag cctgcagcct	240	
	gaagatcttg caacttacta ttgtcaacaa cttggcgctt acccactcac tttcggcggg	300	
	gggaccaagc tggaaactcaa g	321	
10	<210> 37		
	<211> 321		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Región variable de la cadena ligera		
	<400> 37		
	gaggttgtga tgaccagtc cccagcttc ctgtccgcct ctatcggcga ccgggtgtcc	60	
	atcacctgtc ggacctccca gggcatctcc aaccacctgg cctggtatca gcagaagccc	120	
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gcctccagcc tgcagtccgg cgtgccatcc	180	
	agattctcgg gctccggcag cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240	
	gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag gtgaaactcct acccctacac cttcggccag	300	
	gggacacgac tggagctcaa g	321	
20	<210> 38		
	<211> 321		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Región variable de la cadena ligera		
	<400> 38		
30	gagattgtgc tgactcagtc cccctccagc ctgtccgcct ccgtgggcca cagagtgacc	60	
	atcacctgtc gggcctccca gggcatccgg aactacctgg cctggtatca gcagaaaccc	120	
	ggcaagggtc ccaagctgct gatctacgcc acctccaccc tgcagtccgg cgtgccctcc	180	
	cggttctctg gctccagatc cggcaccgag ttcacctga ccatctccag cctgcacccc	240	
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gtggaccggg tcccctacac cttcggccag	300	
	gggaccaagg tggaaactcaa g	321	
35	<210> 39		
	<211> 321		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Región variable de la cadena ligera		

# ES 2 762 622 T3

```

<400> 39
gagatccaga tgaccagtc cccctccagc ctgtccgcct ctgtgggcga cagagtgacc      60
atcacctgtc gggcctccca gggcatctcc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc      120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagctccc tgcagtccgg cgtgccatcc      180
agattctccg gctccggcag cggcaccgag ttcaccctga ccatctccag cctgcagccc      240
gacgacttcg ccacctacta ctgccagaag ctgtcctcct acccctacac cttcggcgga      300
gggaccaagg tggaactcaa g                                                  321

5 <210> 40
  <211> 321
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

10 <220>
  <223> Región variable de la cadena ligera

  <400> 40
  gagattgtgc tgactcagtc cccctccagc ctgtccgcct ccgtgggcga cagagtgacc      60
  atcacctgtc gggcctccca gggcatctcc aactacctgg cctggtatca gcagaaaccc      120
  ggcaagggtc ccaagctgct gatctacgcc gcctccaccc tgcagtccgg cgtgccatcc      180
  agattctccg gctccggcag cggcaccac ttcaccctga ccatctccag cctgcagccc      240
  gaggacgtgg ccacctacta ctgccagaag tgcaactccg cccctacac cttcggccag      300
  gggaccaagg tggaactcaa g                                                  321

15 <210> 41
  <211> 1401
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

20 <220>
  <223> Cadena pesada

  <400> 41

```

ES 2 762 622 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccgag 60  
 gtgcagctgc aggagtcggg gggaggcgtg gtccaagcctg ggaggtccct gagactctcc 120  
 tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatgctatgc actgggtccg ccaggctcca 180  
 ggcaagggg tggagtgggt ggcagttata tcatatgatg gaagcaataa atactacgca 240  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300  
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctatgtatt actgtgagag aactactac 360  
 tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc acgctcaccg tgtcctccgc ctccaccaag 420  
 ggcccttccg tgttccctct ggccccttcc tccaagtcca cctccggcgg caccgccgct 480  
 ctgggctgcc tggggaagga ctacttccct gagcctgtga ccgtgtcctg gaactctggc 540  
 gccctgacct ctggcgtgca caccttctct gctgtcctgc agtccctccg cctgtactcc 600  
 ctgtcctccg tggtgaccgt gccttctctc tccctgggca cccagacctc catctgcaac 660  
 gtgaaccaca agccttccaa caccaaggtg gacaagaagg tggagcctaa gtccctgcgac 720  
 aagaccacaca cctgccctcc ctgccctgcc cctgagctgc tggggcgacc ctccgtgttc 780  
 ctgttccctc ctaagcctaa ggacaccctg atgatctccc ggaccctga ggtgacctgc 840  
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggatcct gaggtgaagt tcaattggtc cgtggacggc 900  
 gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagcct cgggaagagc agtacaactc cacctaccgg 960  
 gtggtgtctg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc 1020  
 aaggtgtcca acaagggcct gcctgtctcc atcgagaaga ccatctcaa ggccaagggc 1080  
 cagcctcggg agcctcaggt gtataccctg cctccctccc gggacgagct gaccaagaac 1140  
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccctt ccgatatcgc cgtggagtgg 1200  
 gagtccaacg gccagcctga gaacaactac aagaccaccc ctctgtgct ggactccgac 1260  
 ggctccttct tcctgtactc caagctgacc gtggacaagt cccgggtgca gcagggcaac 1320  
 gtgttctctc gctcogtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccctg 1380  
 tcctgtctc ctggcaagtg a 1401

<210> 42  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cadena ligera

10

<400> 42  
 atgggctggt cctgcatcat cctgttcttg gtggccaccg ccaccggcgt gcactccgag 60  
 atcgtgatga cccagtctcc atccctcctg tctgttctt taggagacag agtcaccatc 120

ES 2 762 622 T3

acttgtcggg ccagtcaggg cattaagaat tattttgcct ggtatcagca aagaccaggg 180  
 aaagccccta agctcctgat ctatgctaca tccaatttgc aaagtggggt cccatcacga 240  
 ttcagcggca gtggatctgg gacagaattc actctgacaa tcagcagcct gcagcctgaa 300  
 gattttgcaa cttactattg tcaacaactt ggcgcttacc cactcacttt cggcgggggg 360  
 accaagctgg aactcaagcg gaccgtggcc gtccttccg tgttcactct ccctccctcc 420  
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgetgaacaa cttctaccct 480  
 cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccggcaa ctcccaggaa 540  
 tccgtcaccg agcaggactc caaggactct acctactccc tgtcctccac cctgaccctg 600  
 tccaaggccg actacgagaa gcacaagtg tacgcctgcg aagtgacca ccagggcctg 660  
 tcctctcccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgct ga 702

<210> 43  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cadena ligera

10

<400> 43  
 atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcactccgag 60  
 gttgtgatga cccagtcctc cagcttctctg tccgcctcta tcggcgaccg ggtgtccatc 120  
 acctgtcggg cctcccaggg catctccaac cacctggcct ggtatcagca gaagcccggc 180  
 aaggccccca agctgctgat ctacgccgcc tccagcctgc agtccggcgt gccatccaga 240  
 ttctccggct ccggcagcgg caccgacttc acctgacca tcagctccct gcagcccgag 300  
 gatatcgcca cctactactg ccagcaggtg aactcctacc cctacacctt cggccagggg 360  
 acacgactgg agctcaagcg gaccgtggcc gtccttccg tgttcactct ccctccctcc 420  
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgetgaacaa cttctaccct 480  
 cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccggcaa ctcccaggaa 540  
 tccgtcaccg agcaggactc caaggactct acctactccc tgtcctccac cctgaccctg 600  
 tccaaggccg actacgagaa gcacaagtg tacgcctgcg aagtgacca ccagggcctg 660  
 tcctctcccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgct ga 702

<210> 44  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Cadena ligera

20

<400> 44

ES 2 762 622 T3

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcactccgag 60  
 attgtgctga ctcaagtcccc ctccagcctg tccgcctccg tgggcgacag agtgaccatc 120  
 acctgtcggg cctcccaggg catccggaac tacctggcct ggtatcagca gaaacccggc 180  
 aaggtgccca agctgctgat ctacgccacc tccaccctgc agtccggcgt gccctcccgg 240  
 ttctctggct ccagatccgg caccgagttc accctgacca tctccagcct gcaccccagag 300  
 gacttcgcca cctactactg ccagcaggtg gaccggttcc cctacacctt cggccagggg 360  
 accaaggtgg aactcaagcg gaccgtggcc gtccttccg tgttcatctt ccctccctcc 420  
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctaccct 480  
 cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agtccggcaa ctcccaggaa 540  
 tccgtcaccg agcaggactc caaggactct acctactccc tgtcctccac cctgaccctg 600  
 tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgacca ccagggcctg 660  
 tcctctcccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgct ga 702

5 <210> 45  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cadena ligera

<400> 45  
 atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcactccgag 60  
 atccagatga cccagtcccc ctccagcctg tccgcctctg tgggcgacag agtgaccatc 120  
 acctgtcggg cctcccaggg catctccagc tggctggcct ggtatcagca gaagcccggc 180  
 aaggccccca agctgctgat ctacgccgcc agctccctgc agtccggcgt gccatccaga 240  
 ttctccggct ccggcagcgg caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccagc 300  
 gacttcgcca cctactactg ccagaagctg tcctcctacc cctacacctt cggcggaggg 360  
 accaaggtgg aactcaagcg gaccgtggcc gtccttccg tgttcatctt ccctccctcc 420  
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctaccct 480  
 cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agtccggcaa ctcccaggaa 540  
 tccgtcaccg agcaggactc caaggactct acctactccc tgtcctccac cctgaccctg 600  
 tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgacca ccagggcctg 660  
 tcctctcccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgct ga 702

15 <210> 46  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cadena ligera

<400> 46

ES 2 762 622 T3

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcactccgag 60  
 attgtgctga ctcaagtcccc ctccagcctg tccgcctccg tgggcgacag agtgaccatc 120  
 acctgtcggg cctcccaggg catctccaac tacctggcct ggtatcagca gaaacccggc 180  
 aaggtgccca agctgctgat ctacgccgcc tccaccctgc agtccggcgt gccatccaga 240  
 ttctccggct ccggcagcgg caccacttc accctgacca tctccagcct gcagcccagag 300  
 gacgtggcca cctactactg ccagaagtgc aactccgcc cctacacctt cggccagggg 360  
 accaaggtgg aactcaagcg gaccgtggcc gtccttccg tgttcatctt ccctccctcc 420  
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctaccct 480  
 cgggaggcca agtgtagtg gaaggtggac aacgcctcgc agtccggcaa ctcccaggaa 540  
 tccgtcaccg agcaggactc caaggactct acctactccc tgtcctccac cctgaccctg 600  
 tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctcgc aagtgacca ccagggcctg 660  
 tcctctcccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgct ga 702

<210> 47  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 47  
 Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp  
 20 25 30  
 Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser  
 35 40 45  
 Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln  
 50 55 60  
 Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn  
 85 90 95

10

ES 2 762 622 T3

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

Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly  
 115 120 125

Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu  
 130 135 140

Ile Val Leu Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile  
 145 150 155 160

Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro Asp Phe Ser  
 165 170 175

Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser Pro Asn Lys  
 180 185 190

His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val  
 195 200 205

<210> 48  
 <211> 204  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 48  
 Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Leu  
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp  
 20 25 30

Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser  
 35 40 45

Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln  
 50 55 60

Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly  
 65 70 75 80

Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn  
 85 90 95

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

10

ES 2 762 622 T3

Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly  
 115 120 125

Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu  
 130 135 140

Ile Val Leu Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile  
 145 150 155 160

Phe Thr Cys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro Asp Phe Ser Lys  
 165 170 175

Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser Pro Asn Lys His  
 180 185 190

Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val  
 195 200

<210> 49

<211> 146

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln  
 1 5 10 15

Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser  
 20 25 30

Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys  
 35 40 45

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

Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys  
 65 70 75 80

Lys Tyr Arg Ala Glu Ile Val Leu Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr  
 85 90 95

Leu Thr Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile  
 100 105 110

Phe Pro Asp Phe Ser Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val  
 115 120 125

10 Thr Ser Pro Asn Lys His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu  
 130 135 140

Leu Val  
 145

<210> 50

<211> 32

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador

5 <400> 50  
 caggtgtcca ctccgaggtg cagctgcagg ag 32

<210> 51  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Cebador

15 <400> 51  
 gcggaggaca cggtagcgt ggtcccttg ccc 33

<210> 52  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Cebador

25 <400> 52  
 ccggcgtgca ctccgagatc gtgatgaccc ag 32

<210> 53  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Cebador

35 <400> 53  
 gccacgtcc gcttgagttc cagcttggtc cc 32

<210> 54  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Cebador

45 <400> 54  
 gactatgcag ctacggtgc catggcagag gtcagctgc aggagtcggg 50

<210> 55  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Cebador

55 <400> 55  
 gttgacctc cggacttaag gtcgactgag gacacggtga gcgtggtcc 49

60

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína que se une a CD83 aislada o recombinante que comprende un dominio que se une a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a CD83 y comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL), en donde:
  - 5 (a) la región variable de la cadena pesada (VH) comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1; y
  - (b) la región variable de la cadena ligera (VL) comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 7.
2. La proteína que se une a CD83 según la reivindicación 1, en la que la VL y VH están en una sola cadena polipeptídica, y la proteína que se une a CD83 es:
  - 10 (i) un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv); o
  - (ii) un scFv dimérico (di-scFv); o
  - (iii) (i) o (ii) ligado a un Fc o a un dominio constante de la cadena pesada (CH) 2 y/o CH3; o
  - (iv) (i) o (ii) ligado a una proteína que se une a una célula efectora inmune,
  - 15 o en donde VL y VH están en cadenas polipeptídica distintas, y la proteína que se une a CD83 es:
    - (v) un diacuerpo; o
    - (vi) un triacuerpo; o
    - (vii) un tetracuerpo; o
    - (viii) un Fab; o
    - 20 (ix) un F(ab')<sub>2</sub>; o
    - (x) un Fv; o
    - (xi) uno de (v) a (x) ligado a un Fc o un CH<sub>2</sub> y/o CR<sub>3</sub>; o
    - (xii) uno de (v) a (x) ligado a una proteína que se une a una célula efectora inmune.
3. La proteína que se une a CD83 según la reivindicación 1, que es un anticuerpo.
- 25 4. La proteína que se une a CD83 según la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 29 y una secuencia de la cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 32.
5. La proteína que se une a CD83 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una proteína química, desimmunizada, humanizada, humanizada sintética, humana, primatizada o compuesta.
- 30 6. La proteína que se une a CD83 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una región Fc capaz de inducir un nivel mejorado de función efectora en comparación con una región Fc de IgG1 humana y/o que confiere una semivida prolongada en comparación con una región Fc de IgG1 humana.
7. La proteína que se une a CD83 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, conjugada con un compuesto.
8. Un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica la proteína que se une a CD83 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 35 9. El ácido nucleico según la reivindicación 8, que comprende una secuencia de nucleótidos como se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 35, 38 o 44, o un ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de nucleótidos como se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 35, 38 o 44 en condiciones de hibridación rigurosas de moderadas a altas.
- 40 10. Una estructura artificial de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 9, ligado funcionalmente a un promotor.
11. Una célula aislada que expresa la proteína que se une a CD83 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una célula recombinante modificada genéticamente para expresar la proteína que se une a CD83 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

12. La célula según la reivindicación 11, que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 8 o 9, o la estructura artificial de expresión según la reivindicación 10.
13. Una composición que comprende la proteína que se une a CD83 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un vehículo adecuado, preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 14. La proteína que se une a CD83 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición según la reivindicación 13, para uso en el tratamiento o la prevención de alergias, asma, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad de hospedador contra injerto, miastenia grave, esclerosis múltiple, vasculitis, Morbus Crohn o colitis ulcerosa, Morbus Bechterew, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de insulina o SIDA.
- 10 15. La proteína que se une a CD83 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el ácido nucleico según la reivindicación 8 o 9, o la estructura artificial de expresión según la reivindicación 10, la célula según 11 o 12, o la composición según la reivindicación 13, para uso como un medicamento.

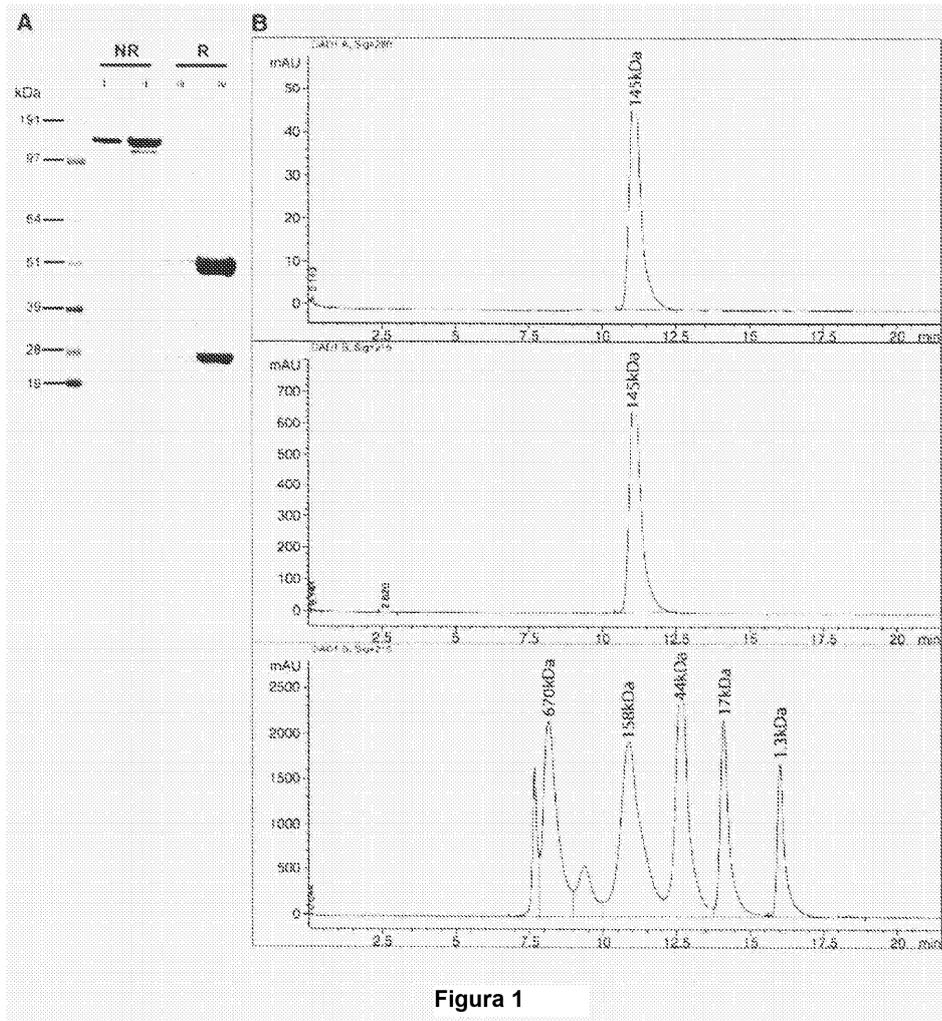
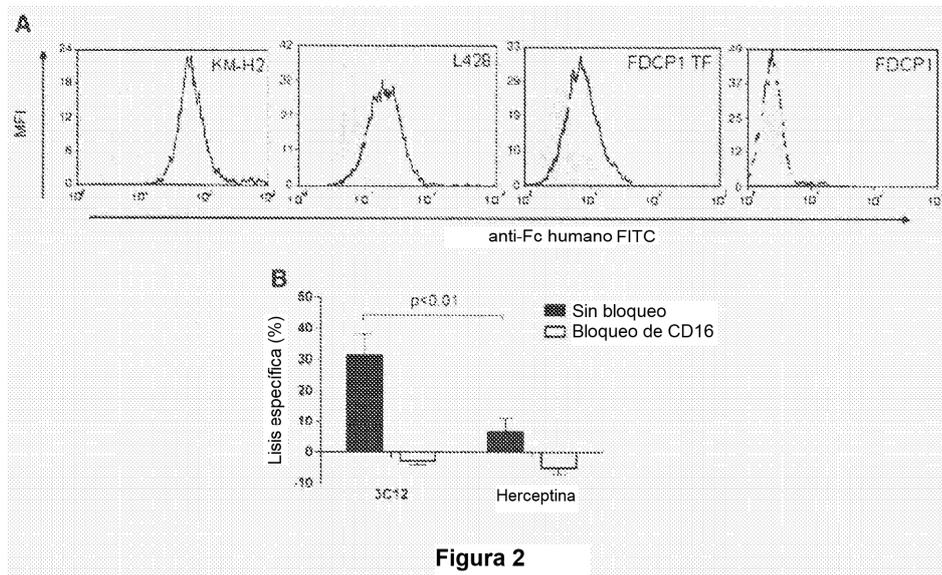
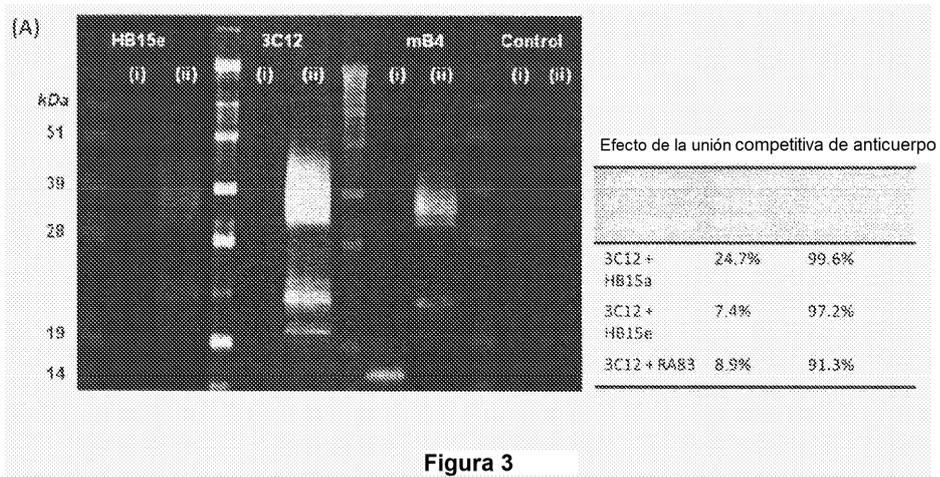
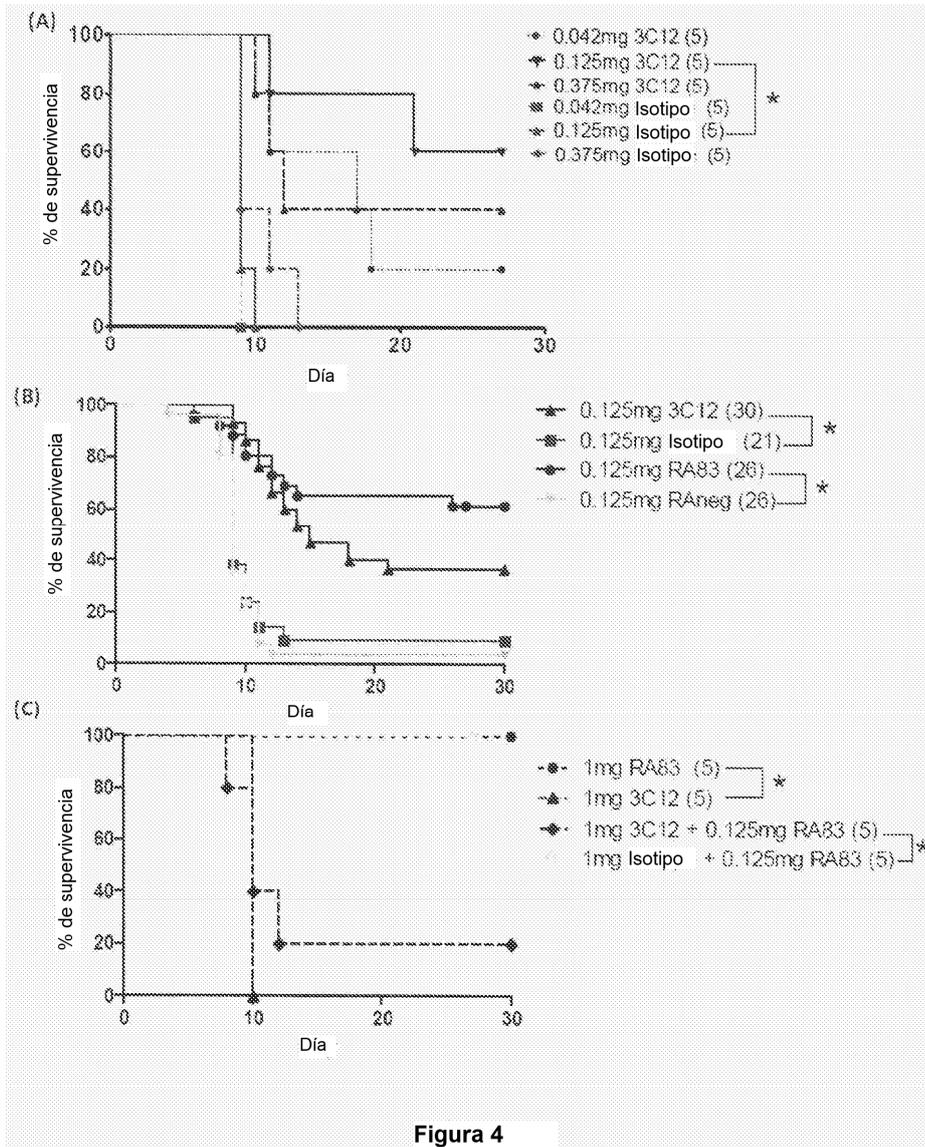


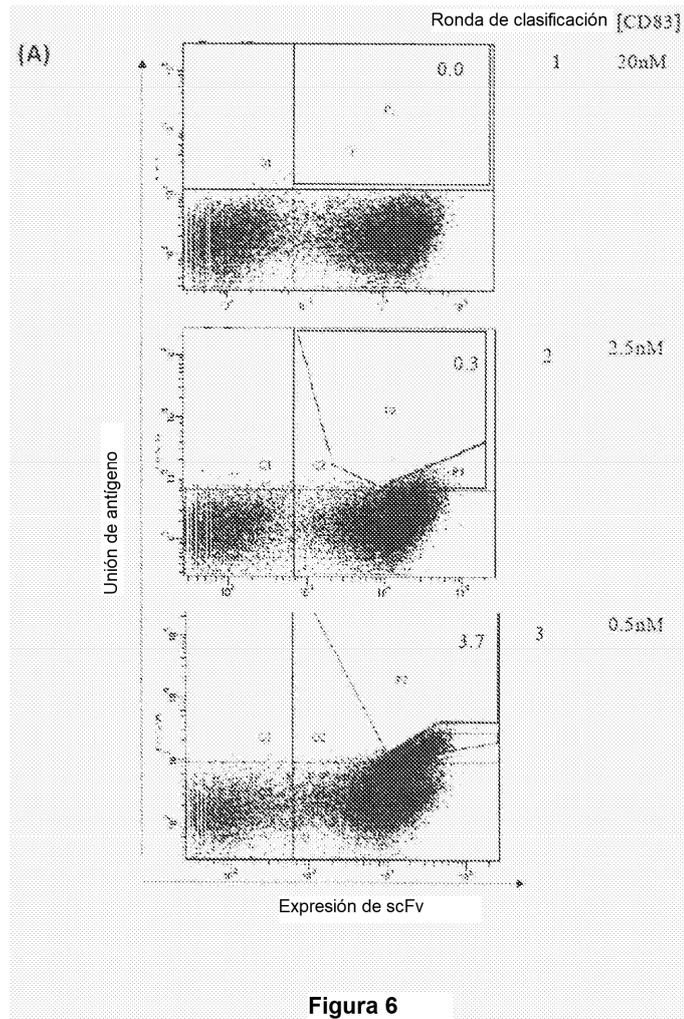
Figura 1



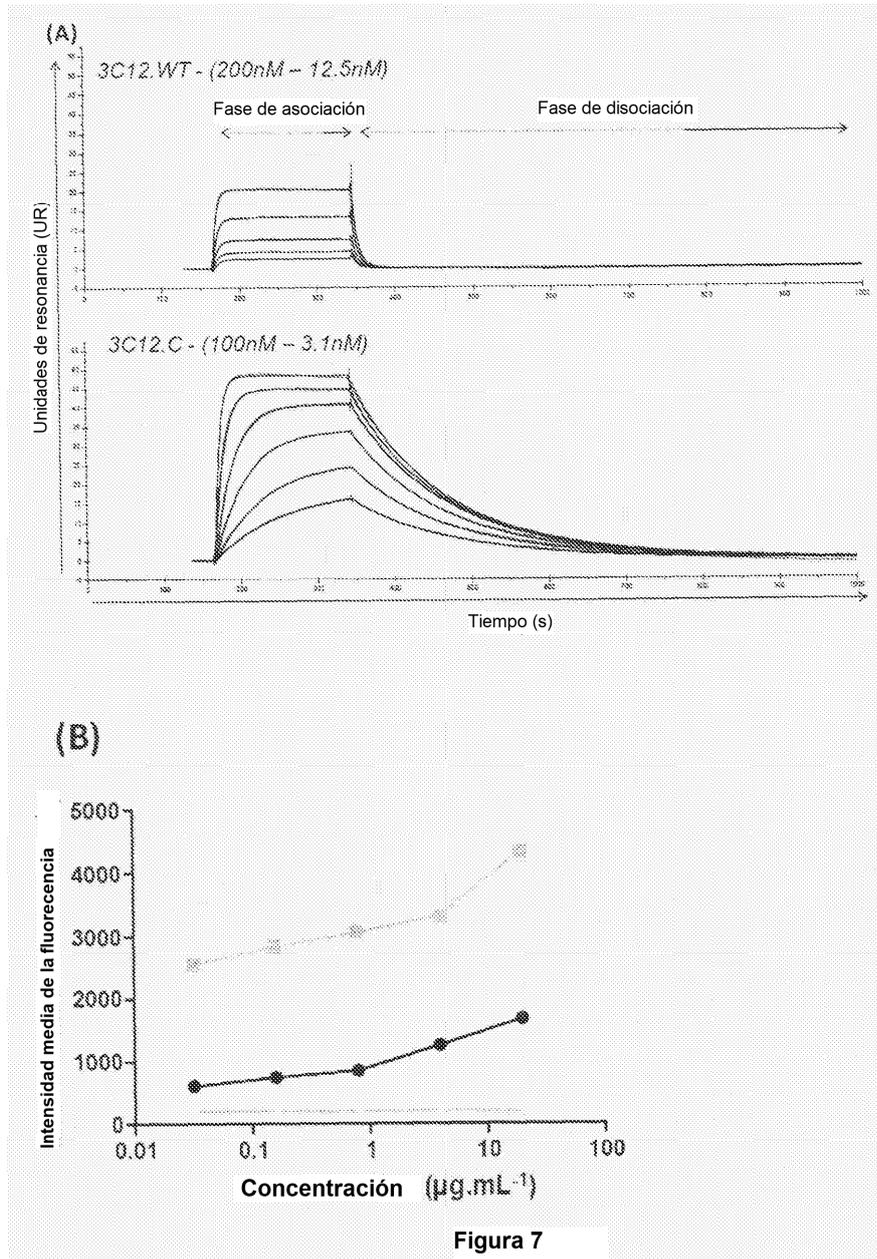












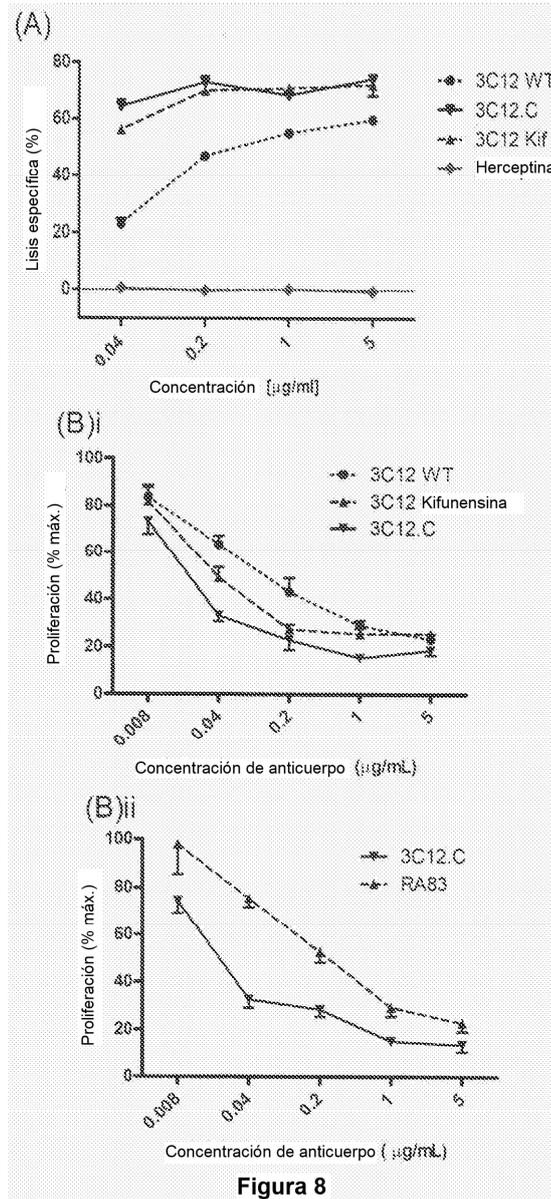


Figura 8

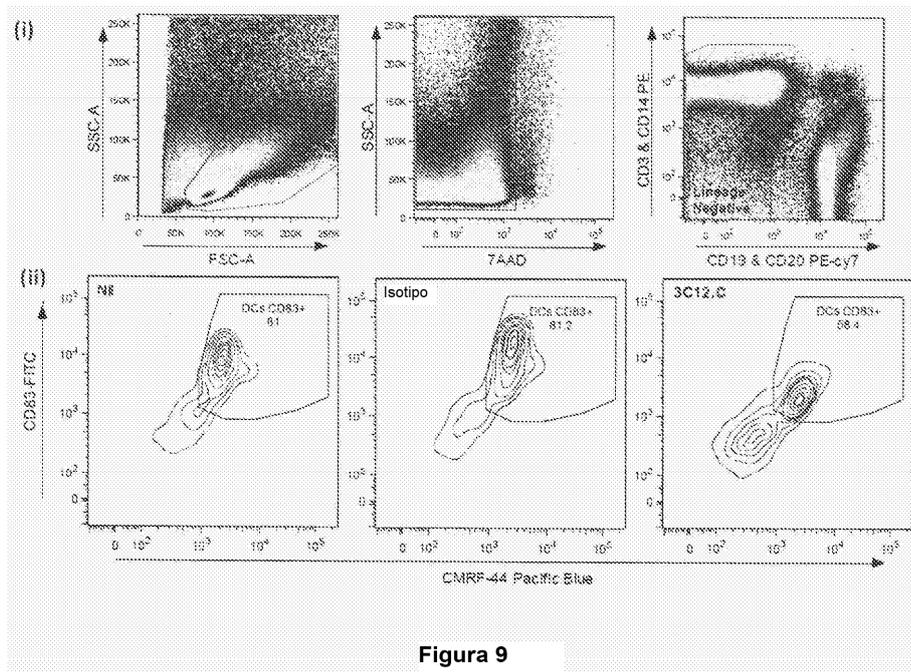
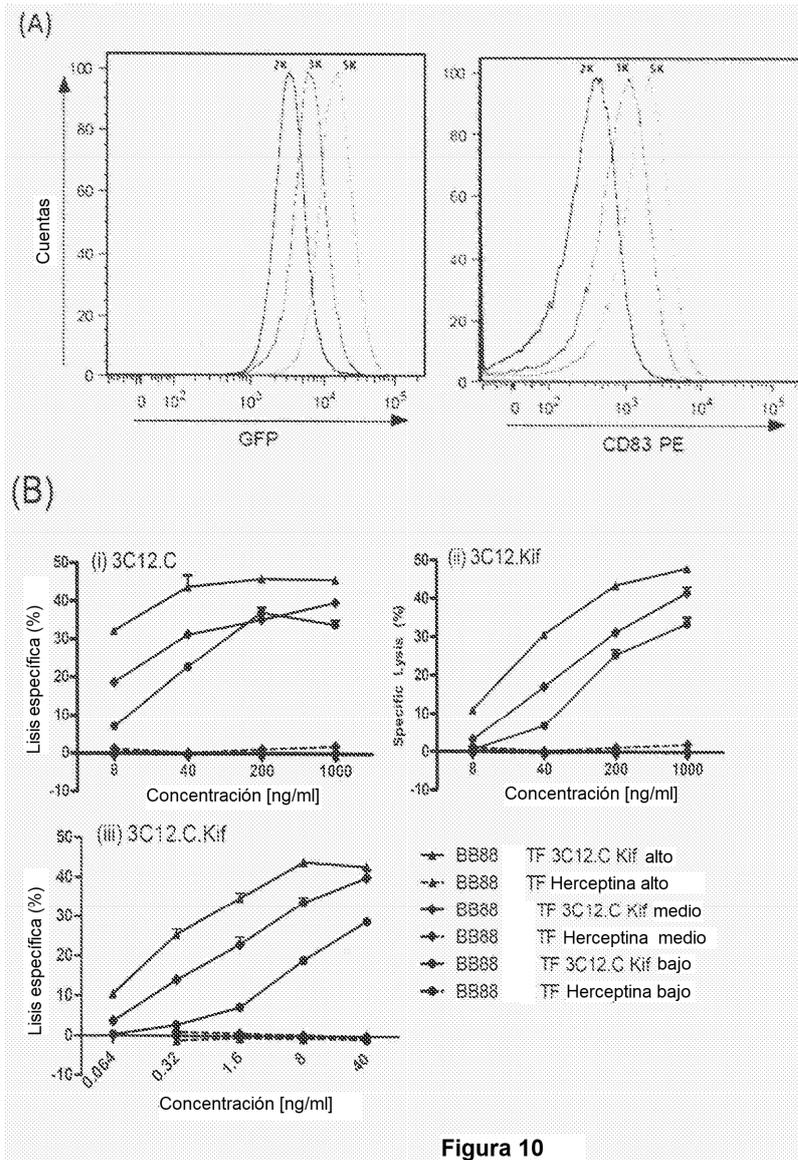


Figura 9



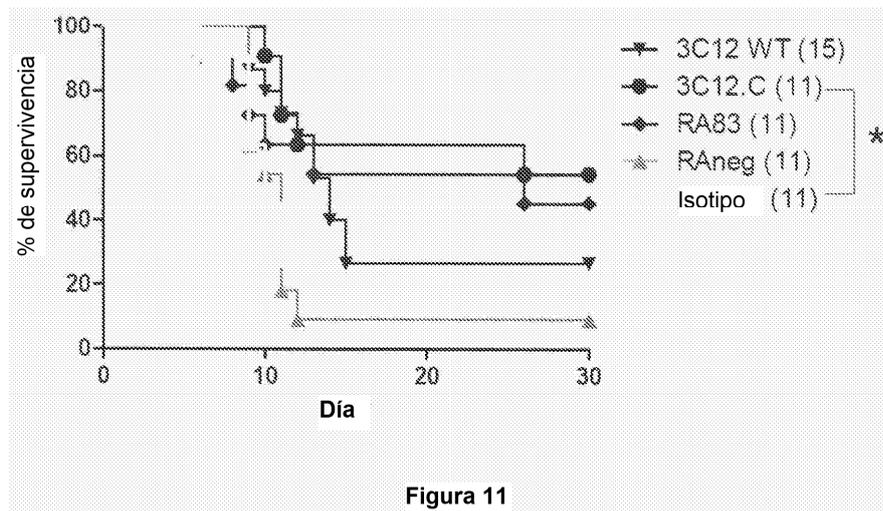


Figura 11