

COMBINACIONES FARMACÉUTICAS

INTRODUCCIÓN

La presente divulgación se refiere en general a los campos de la inmunología y la
5 biología molecular. Más específicamente, se proporcionan combinaciones
farmacéuticas que comprenden (A) anticuerpos, o porciones de unión a antígeno
de estos, dirigidas contra LY75, y (B) una segunda entidad contra el cáncer;
ácidos nucleicos que codifican combinaciones de anticuerpos; métodos para
preparar combinaciones de anticuerpos; y métodos para el tratamiento de
10 enfermedades, tales como cánceres mediados por la expresión o la actividad de
LY75.

ANTECEDENTES

Las leucemias y los linfomas pertenecen a un amplio grupo de tumores que
afectan la sangre, la médula ósea y el sistema linfático; estos se conocen como
15 tumores de los tejidos hematopoyético y linfoide.

El linfoma es un grupo de tumores de las células sanguíneas, que se desarrolla a
partir de los linfocitos. Los signos y síntomas pueden incluir agrandamiento de los
nódulos linfáticos, fiebre, sudoración, pérdida de peso involuntaria, comezón y
permanente sensación de cansancio. Existe un número de subtipos de linfomas:
20 las dos categorías principales de linfomas son linfomas de Hodgkin (HL, por sus
siglas en inglés) y linfomas no Hodgkin (NHL, por sus siglas en inglés). La
Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) incluye otras
dos categorías como tipos de linfoma: mieloma múltiple y enfermedades
inmunoproliferativas. Aproximadamente el 90 % de los linfomas son linfomas no
25 Hodgkin.

La leucemia es un grupo de cánceres que usualmente comienzan en la médula
ósea y resultan en altos números de glóbulos blancos anormales. Los síntomas

pueden incluir problemas de sangrado y hematomas, cansancio, fiebre y aumento del riesgo de infecciones. Estos síntomas aparecen debido a la falta de células sanguíneas normales. El diagnóstico generalmente se hace mediante análisis de sangre o biopsia de médula ósea. Existen cuatro tipos principales de leucemia:

5 leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia mieloide crónica (CML, por sus siglas en inglés), como así también un número de tipos menos comunes.

El tratamiento de las leucemias y los linfomas puede suponer una o varias entre

10 quimioterapia, terapia de radiación, terapia dirigida y cirugía (y trasplante de médula ósea en el caso de leucemias). El éxito del tratamiento de la leucemia depende del tipo de leucemia y la edad de la persona. El resultado del tratamiento del linfoma depende del subtipo, siendo algunos curables y tratamientos que prolongan la supervivencia en la mayoría de los casos.

15 Una cantidad de agentes quimioterapéuticos se han usado con anterioridad para el tratamiento de leucemias, que incluyen, prednisona, vincristina, antraciclinas, L-asparaginasa, ciclofosfamida, metotrexato, 6-mercaptopurina, fludarabina, pentostatina y cladribina. Los agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de linfomas incluyen ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina (también conocida como

20 doxorubicina o adriamicina), oncovin (vincristina), prednisona, prednisolona, bleomicina, dacarbazina, etopósido y procarbazona.

La quimioterapia de combinación supone tratar a un paciente con dos o más fármacos diferentes simultáneamente. Los fármacos pueden diferir en sus mecanismos y efectos secundarios. La mayor ventaja de esta terapia es minimizar

25 las posibilidades de desarrollo de resistencia a cualquiera de los agentes. Además, los fármacos a menudo se pueden usar en dosis menores, reduciendo la toxicidad. Las terapias de combinación para el tratamiento de la enfermedad de

Hodgkin incluye MOPP (mustina, vincristina, procarbazona, prednisona) y ABVD (doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina). Las terapias de combinación para el tratamiento de linfoma no Hodgkin incluyen CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona). Dado el número de fármacos conocidos para el tratamiento de leucemias y linfomas, el número de permutaciones y combinaciones de posibles terapias con fármacos es claramente grande. Además, las terapias de combinación mencionadas no incluyen anticuerpos.

No obstante, persiste la necesidad de tratamientos nuevos para las leucemias y los linfomas, y particularmente de terapias de combinación eficaces.

- 10 El antígeno linfocitario 75 actúa como un receptor endocítico para dirigir antígenos capturados desde el espacio extracelular hasta un compartimiento de procesamiento de antígenos especializado y se cree que causa una reducción en la proliferación de linfocitos B. La expresión del antígeno linfocitario 75 ha sido observada en cánceres pancreáticos, ováricos, mamarios, colorrectales, esofágicos, cutáneos, tiroideos y pulmonares (no de células pequeñas) así como también en el Mieloma Múltiple y en muchos subtipos diferentes de linfomas y leucemias. WO2009/061996 describe anticuerpos monoclonales aislados los cuales se unen a DEC-205 humano (LY75) y composiciones y moléculas basadas en anticuerpos relacionadas. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos, así como también métodos terapéuticos y de diagnóstico para utilizar los anticuerpos. WO2008/104806 describe reactivos de afinidad capaces de unirse a LY75 para utilizar en el tratamiento o profilaxis del cáncer. WO2015/052537 divulga anticuerpos aislados específicos capaces de unirse a LY75 y su uso en el tratamiento de varios cánceres.

Rituximab es un anticuerpo monoclonal contra la proteína CD20 que está ampliamente expresada en células B (*Oncogene* (20 de octubre de 2003), Smith

MR, *“Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance”*, 22(47): 7359-68). Rituximab destruye tanto las células B normales como las malignas que tienen CD20 en su superficie y, por lo tanto, se usa para tratar enfermedades que se caracterizan por tener demasiadas células B, células

5 B hiperactivas o células B disfuncionales. Rituximab se ha usado anteriormente para tratar una cantidad de enfermedades autoinmunes y algunos tipos de cáncer, inclusive artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica idiopática, pénfigo vulgar, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, linfoma no Hodgkin, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, leucemia linfocítica crónica y

10 anemias autoinmunes.

Ibrutinib (Imbruvica) es un fármaco de molécula pequeña que se une permanentemente a la tirosina quinasa de Bruton (BTK), que es importante en las células B. Ibrutinib se ha usado anteriormente para tratar cánceres de células B como linfoma de células de manto, leucemia linfocítica crónica, y

15 macroglobulinemia de Waldenström.

Ahora se ha descubierto que combinaciones de (i) ciertos anticuerpos anti LY75 con Rituximab y (ii) ciertos anticuerpos anti LY75 con Ibrutinib demostraron resultados sinérgicos en el tratamiento de linfomas.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

20 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: (A) un anticuerpo anti LY75, o una porción de unión al antígeno del mismo, el cual compete por la unión a LY75 con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera que

25 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 2; o un anticuerpo anti LY75 o una porción de unión al antígeno del mismo, dicho anticuerpo comprende:

- a) una región variable de cadena pesada que comprende:
- i) una primera vhCDR que comprende SEQ ID NO: 5;
 - ii) una segunda vhCDR que comprende SEQ ID NO: 6; y
 - iii) una tercera vhCDR que comprende SEQ ID NO: 7; y
- 5 b) una región variable de cadena ligera que comprende:
- i) una primera vlCDR que comprende SEQ ID NO: 8;
 - ii) una segunda vlCDR que comprende SEQ ID NO: 9; y
 - iii) una tercera vlCDR que comprende SEQ ID NO: 10;
- opcionalmente donde una cualquiera o varias de las SEQ ID NO mencionadas
- 10 comprende independientemente una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos;
- y
- (B) un anticuerpo anti CD20, o una porción de unión al antígeno del mismo, dicho anticuerpo comprende:
- 15 a) una región variable de cadena pesada que comprende:
- i) una primera vhCDR que comprende SEQ ID NO: 40;
 - ii) una segunda vhCDR que comprende SEQ ID NO: 41; y
 - iii) una tercera vhCDR que comprende SEQ ID NO: 42; y
- b) una región variable de cadena ligera que comprende:
- 20 i) una primera vlCDR que comprende SEQ ID NO: 43;
- ii) una segunda vlCDR que comprende SEQ ID NO: 44; y
 - iii) una tercera vlCDR que comprende SEQ ID NO: 45;
- opcionalmente donde una cualquiera o varias de las SEQ ID NO mencionadas
- comprende independientemente una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones,
- 25 adiciones o deleciones de aminoácidos;
- donde la combinación farmacéutica está en la forma de una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende:

(A) un anticuerpo anti LY75, o una porción de unión al antígeno del mismo que compete por la unión a LY75 con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2;

o

un anticuerpo anti LY75, o una porción de unión al antígeno del mismo, dicho anticuerpo comprende:

a) una región variable de cadena pesada que comprende:

i) una primera vhCDR que comprende SEQ ID NO: 5;

ii) una segunda vhCDR que comprende SEQ ID NO: 6; y

iii) una tercera vhCDR que comprende SEQ ID NO: 7; y

b) una región variable de cadena ligera que comprende:

i) una primera vlCDR que comprende SEQ ID NO: 8;

ii) una segunda vlCDR que comprende SEQ ID NO: 9; y

iii) una tercera vlCDR que comprende SEQ ID NO: 10;

opcionalmente donde una cualquiera o varias de las SEQ ID NO mencionadas comprende independientemente una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos;

y

(B) ibrutinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

donde la combinación farmacéutica está en la forma de una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial.

En una realización, el anticuerpo anti LY75 o una porción de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende 1, 2 o 3

CDRs seleccionadas del grupo que consiste en CDRs que comprenden SEC ID NOs: 5, 6, y 7, y/o una región variable de cadena ligera que comprende 1, 2 o 3 CDRs seleccionadas del grupo que consiste en CDRs que comprenden SEC ID NOs: 8, 9 y 10.

- 5 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti LY75 se unen a LY75 (SEC ID NO: 15) y son capaces de ser internalizados por una célula que expresa LY75.

En otra realización, el anticuerpo anti LY75 comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDRs, por sus siglas en inglés) de cadena pesada y/o ligera o regiones variables (VRs, por sus siglas en inglés) del anticuerpo particular descrito en esta invención (por ej., denominado en esta invención "LY75_A1"). Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo comprende los dominios de CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable (VH, por sus siglas en inglés) de cadena pesada de anticuerpo LY75_A1 que tiene la secuencia mostrada en SEC ID NO:1, y/o los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable (VL, por sus siglas en inglés) de cadena ligera de LY75_A1 que tiene la secuencia mostrada en SEC ID NO:2.

En otra realización, los anticuerpos anti LY75 se unen a LY75 humano e incluyen una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO: 1, y/o sus modificaciones de secuencia conservadoras. El anticuerpo puede incluir además una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID NO: 2, y/o sus modificaciones conservadoras de secuencia.

En una realización adicional, los anticuerpos anti LY75 se unen a LY75 humana e incluyen una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera incluyendo las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NOs: 1 y/o 2, respectivamente, y sus modificaciones conservadoras de secuencia.

Los anticuerpos los cuales incluyen regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen por lo menos 80%, o por lo menos 85%, o por lo menos 90%, o por lo

menos 91%, o por lo menos 92%, o por lo menos 93%, o por lo menos 94%, o por lo menos 95%, o por lo menos 96%, o por lo menos 97%, o por lo menos 98%, o por lo menos 99%, o más de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias antes mencionadas son también incluidos en la presente invención.

- 5 Los rangos intermedios de los valores antes mencionados, por ej. regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen por lo menos 80–85%, 85–90%, 90–95% o 95–100% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias antes mencionadas también se pretende que se encuentren incluidos en la presente invención.
- 10 En una realización, el anticuerpo anti LY75 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO:1 o una secuencia que es por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% idéntica a
- 15 SEC ID NO: 1. En otra realización, el anticuerpo anti LY75 comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID NO:2 o una secuencia que es por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% idéntica a
- 20 SEC ID NO: 2. En otra realización, el anticuerpo anti LY75 comprende una región de estructura de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%
- 25 idéntica a la estructura de la región variable de cadena pesada de SEC ID NO: 1 como se muestra en SEC ID NOS: 16, 17, 18 y 19. En otra realización, el anticuerpo anti LY75 comprende una región de estructura de cadena ligera que

comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% idéntica a la estructura de la
5 región variable de cadena ligera de SEC ID NO:2 como se muestra en SEC ID NOS: 20, 21, 22 y 23.

En una realización, el anticuerpo anti LY75 compite por la unión a LY75 con un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NOs:1 y 2,
10 respectivamente, o las secuencias de aminoácidos por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% idénticas a las mismas. En otra realización, el anticuerpo anti LY75 compite por la unión a LY75 con un
15 anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NOs:1 y 2 (LY75_A1).

Otros anticuerpos de la invención se unen al mismo epítipo o a un epítipo en LY75 reconocido por los anticuerpos descritos en esta invención. En otra
20 realización particular, el anticuerpo se une a un epítipo en LY75 reconocido por un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NOs:1 y 2, respectivamente, o secuencias de aminoácidos por lo menos 80% idénticas a las mismas. En otra realización, el anticuerpo se une a un epítipo en LY75
25 reconocido por un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NOs:1 y 2 (LY75_A1).

En una realización adicional, los anticuerpos anti LY75 se unen específicamente a uno o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, péptido(s) seleccionados del grupo que comprende SEC ID NOs: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 o 37 o sus fragmentos, donde dichos fragmentos comprenden por lo menos 2, 5 por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9 o por lo menos 10 aminoácidos contiguos. En una realización adicional, el epítipo reconocido por los anticuerpos anti LY75 comprende uno o más péptidos, dos o más o tres o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEC ID NOs: 27, 29, 30, 34, 35, 36 o 37 o sus 10 fragmentos donde dichos fragmentos comprenden por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9 o por lo menos 10 aminoácidos contiguos. En una realización adicional, el epítipo reconocido por los anticuerpos anti LY75 comprende uno o más péptidos, dos o tres péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEC 15 ID NOs: 30, 36 y 37 o sus fragmentos donde dichos fragmentos comprenden por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9 o por lo menos 10 aminoácidos contiguos.

En una realización adicional, los anticuerpos anti LY75 comprenden CDRs 20 variables en comparación con los anticuerpos parentales descritos en esta invención. Por ende, los anticuerpos variantes comprenden regiones variables variantes de un anticuerpo parental, donde el anticuerpo parental comprende una primera vhCDR que comprende SEC ID NO:5, una segunda vhCDR que comprende SEC ID NO: 6, una tercera vhCDR que comprende SEC ID NO:7, una 25 primera vlCDR que comprende SEC ID NO:8, una segunda vlCDR que comprende SEC ID NO:9 y una tercera vlCDR que comprende a SEC ID NO:10, y donde el anticuerpo variante tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos

colectivamente en el conjunto de la primera vhCDR, la segunda vhCDR, la tercera vhCDR, la primera vlCDR, la segunda vlCDR y la tercera vlCDR, con entre 1 y 4, 1 a 3 o 1 a 2 sustituciones de uso particular, y donde el anticuerpo retiene la unión específica a LY75.

- 5 Todos los anticuerpos divulgados en la presente pueden ser de longitud completa, por ejemplo, cualquiera de los siguientes isotipos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, e IgE. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser fragmentos tal como una porción de unión al antígeno o un anticuerpo de cadena simple (por ej., un Fab, F(ab')₂, Fv, un fragmento Fv de cadena simple, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o una combinación de dos o
- 10 más CDRs aisladas). Los anticuerpos pueden ser cualquier clase de anticuerpo, incluyendo, entre otros, anticuerpos humanos, humanizados y quiméricos.

- En otras realizaciones, los anticuerpos anti LY75 están en la forma de un inmunoconjugado (es decir, incluyen además un resto covalentemente unido). En
- 15 una realización particular, el resto es un fármaco, tal como un maitansinoide, una dolastatina, una auristatina, un tricoteceno, una calicheamicina, CC1065 o sus derivados. En una realización preferida, el resto de fármaco es DM1 o DM4.

- En una realización, el anticuerpo LY75 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera codificada por secuencias de
- 20 ácidos nucleicos que comprenden SEC ID NOs: 3 y 4, respectivamente, o secuencias de ácidos nucleicos que tienen por lo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con las secuencias de ácidos nucleicos antes mencionadas las cuales difieren de SEC ID NOs: 3 y 4 debido a la degeneración del código genético.

- 25 En una realización, el anticuerpo anti CD20 es un anticuerpo quimérico murino/humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Preferentemente, el anticuerpo anti CD20 es Rituximab.

En otro aspecto de la presente invención se proporcionan kits de vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos descritos en la presente ligados operativamente a uno o más elementos reguladores.

5 En una realización preferida la célula huésped comprende vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican:

- (i) la cadena pesada del anticuerpo anti LY75 o su porción de unión al antígeno,
- (ii) la cadena ligera del anticuerpo anti LY75 o su porción de unión al antígeno,
- (iii) la cadena pesada del anticuerpo anti CD20 o su porción de unión al antígeno;

10 y

- (iv) la cadena ligera del anticuerpo anti CD20 o su porción de unión al antígeno.

En un aspecto adicional se proporciona un método para tratar cáncer en un paciente que comprende administrar simultáneamente, secuencialmente o separadamente a un paciente que las necesita cantidades terapéuticamente
15 eficaces de los componentes (A) y (B) de una combinación farmacéutica de la invención.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una combinación farmacéutica de la invención para utilizar en el tratamiento de cáncer.

Se proporciona además el uso de los componentes (A) y (B) como se definen en
20 la presente, en la manufactura de una combinación farmacéutica para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento del cáncer. En una realización, el cáncer es preferentemente leucemia o linfoma.

En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma no de Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), Linfoma de
25 Células B, Linfoma Folicular, Linfoma de Células del Manto, Linfoma de Tejido Linfoide Asociado con Mucosa (MALT, por sus siglas en inglés), Linfoma de Células B Ricas en Histiocitos/ Células T, Linfoma de Burkitt, Linfoma

Linfoplasmacítico, Linfoma Linfocítico de Células Pequeñas, Linfoma de Zona Marginal, Linfoma de Células T, Linfoma Periférico de Células T, Linfoma de Células Grandes Anaplásico y Linfoma de Células T Angioinmunoblástico, leucemia mieloide agudo y leucemia linfocítica crónica. Más preferentemente, el
 5 cáncer es DLBCL o linfoma no Hodgkin.

También se encuentran dentro del alcance de la invención los kits que comprenden una combinación farmacéutica de la invención y, opcionalmente, instrucciones para el uso. El kit puede contener además por lo menos un reactivo adicional o uno o más anticuerpos adicionales.

10 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra la alineación de la cadena pesada de LY75_A1 (SEC ID NO:1),
 15 la Línea germinal de VH 3–15 humano (SEC ID NO:11) y la Línea germinal de JH4 humana (SEC ID NO:12). Las regiones CDR de la cadena pesada de LY75_A1 se encuentran subrayadas.

La Figura 2 ilustra la alineación de la cadena ligera de LY75_A1 (SEC ID NO:2), la Línea Germinal de VK O12 humana (SEC ID NO:13) y la Línea Germinal de JK4
 20 humana (SEC ID NO:14). Las regiones CDR de la cadena ligera de LY75_A1 se encuentran subrayadas.

La Figura 3a ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos monoclonales anti LY75 conjugados con DM1 en HT–29 y muestra que mientras que la mayoría de los anticuerpos se unen a LY75 solamente unos pocos exhiben eficacia.

25 La Figura 3b ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en HT–29.

La Figura 3c ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células RAJI.

La Figura 3d ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células Namalwa.

- 5 La Figura 3e ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células Karpas 299.

La Figura 3f ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células BxPC3.

- 10 La Figura 3g ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células HupT4.

La Figura 3h ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células HPAFFII.

Figura 3i ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células EHEB.

- 15 La Figura 3j ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células Mec-1.

La Figura 3k ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células AML-193.

- 20 La Figura 3l ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células HCC 70.

La Figura 3m ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células HCC 1806.

La Figura 3n ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células MDA-MB-468.

- 25 La Figura 3o ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células RT4.

La Figura 3p ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células 5637.

La Figura 3q ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células SW780.

- 5 La Figura 3r ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células SCC-9.

La Figura 3s ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células OE 19.

- 10 La Figura 3t ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células OVCAR-3.

La Figura 3u ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células SK-OV-3.

La Figura 3v ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células MOLP-8.

- 15 La Figura 3w ilustra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en células RPMI8226.

La Figura 4a ilustra la eficacia de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en el modelo de xenoinjerto en ratón SCID de linfoma de Raji Burkitt.

- 20 La Figura 4b ilustra la eficacia de los anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en modelo de xenoinjerto en ratón SCID de linfoma de Burkitt Namalwa.

La Figura 4c ilustra la eficacia de los anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en modelo de xenoinjerto de ratón desnudo atímico de adenocarcinoma pancreático HPAFII.

- 25 La Figura 4d ilustra la eficacia de los anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en el modelo de xenoinjerto de ratón SCID de carcinoma de vejiga humano SW780.

La Figura 4e ilustra la eficacia de los anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en el modelo de xenoinjerto de ratón desnudo atímico MDA-MB-468.

La Figura 4f ilustra la eficacia de los anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 o DM4 en el modelo de xenoinjerto de ratón desnudo atímico de adenocarcinoma colorrectal COLO205.

La Figura 5a muestra la unión competitiva de anti LY75-mAb y un anti LY75-mAb conjugado a MCC-DM1.

La Figura 5b muestra la unión no competitiva de LY75_A1 y un anti LY75-mAb conjugado a MCC-DM1.

Las Figuras 6a-6j muestran representaciones gráficas de la unión del anticuerpo LY75_A1 a péptidos LY75 en un microarreglo peptídico.

La Figura 7 muestra una alineación de aminoácidos de péptidos unidos por el anticuerpo LY75_A1 en el ensayo de microarreglos peptídicos y en el ensayo de interacción y precipitación ("pull down") de péptidos. Los péptidos resaltados son aquellos con probabilidades de formar el epítipo reconocido por el anticuerpo LY75_A1.

Las Figuras 8A y 8B muestran el efecto antiproliferativo de diferentes dosis (nM) de LY75_DM4 como un tratamiento simple o en combinación con Rituximab en dos líneas celulares diferentes ABC-DLBCL (TMD8 y HBL 1). (CI = Índice de combinación Chou-Talalay). Figura 8A: CI mediano = 0,27. Figura 8B: CI mediano = 0,57

La Figura 9 muestra el efecto antiproliferativo de diferentes dosis (nM) de LY75_DM4 como un tratamiento simple o en combinación con Ibrutinib en líneas celulares HBL-1 (ABC-DLBCL). (CI = Índice de combinación Chou-Talalay). CI mediano = 0,24.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente divulgación se relaciona con combinaciones farmacéuticas que comprenden los componentes (A) y (B) como se definen en la presente, donde la combinación farmacéutica está en la forma de una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial. El componente (A) está relacionado con un anticuerpo anti LY75 como se define en la presente. El componente (B) se relaciona con (i) un anticuerpo anti CD20 como se define en la presente o (ii) con ibrutinib o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Un ejemplo de la proteína LY75 se brinda en SEQ ID NO: 15 en la presente. Las expresiones “anticuerpos anti LY75” y “anticuerpos LY75” se usan de manera intercambiable en la presente.

Los anticuerpos LY75 divulgados en la presente pueden ser internalizados cuando se contactan con células que expresan al receptor de LY75. Según lo discutido en este documento, el receptor de LY75 es sobreexpresado y /o diferencialmente expresado en ciertas células cancerígenas, incluyendo entre otros, leucemia, preferentemente leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica crónica, linfoma, preferentemente DLBCL, Linfoma de Células B, Linfoma Folicular, Linfoma de Células del Manto, Linfoma de Tejido Linfoide Asociado a Mucosa (MALT), Linfoma de Células T/ Células B ricas en Histiocitos, Linfoma de Burkitt, Linfoma Linfoplasmacítico, Linfoma Linfocítico de Células Pequeñas, Linfoma de Zona Marginal, Linfoma de Células T, Linfoma Periférico de Células T, Linfoma Anaplásico de Células Grandes y Linfoma Angioinmunoblástico de Células T.

Como tales, cuando los anticuerpos LY75 divulgados en la presente son conjugados a fármacos (algunas veces denominado en esta invención como “conjugados anticuerpo-fármaco” o “ADCs”), la internalización de estas moléculas de ADC en células cancerígenas da como resultado la muerte celular y por ende el tratamiento tumoral.

Los anticuerpos anti LY75 poseen características estructurales particulares tales como regiones CDR con secuencias de aminoácidos particulares. Se describe en la presente invención un conjunto de CDRs que pueden formar un reactivo de afinidad, por ej. un anticuerpo, el cual exhibe unión a LY75.

- 5 Por lo tanto, la descripción proporciona anticuerpos, preferentemente anticuerpos aislados (los cuales, según lo expuesto más adelante, incluye una amplia variedad de estructuras de anticuerpo bien conocidas, derivados, miméticos y conjugados), ácidos nucleicos que codifican combinaciones de anticuerpos, células huéspedes utilizadas para preparar combinaciones de anticuerpos,
- 10 métodos para preparar combinaciones de anticuerpos, y combinaciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y opcionalmente un portador farmacéutico, métodos de tratamiento que comprenden el uso de combinaciones farmacéuticas y el uso de las combinaciones farmacéuticas para el tratamiento de cánceres.
- 15 El antígeno linfocitario 75 actúa como un receptor endocítico para dirigir los antígenos capturados desde el espacio extracelular hasta un compartimiento de procesamiento de antígeno especializado y se cree que causa una reducción en la proliferación de linfocitos B.

- De acuerdo con SWISS-PROT, el antígeno linfocitario 75 es expresado en
- 20 linfocitos del bazo, timo, colon y sangre periférica. Ha sido detectado en líneas de células mieloides y linfoides B. Las isoformas designadas en la presente invención OGTA076b y OGTA076c son expresadas en células de linfoma de Hodgkin maligno denominadas células de Hodgkin y Reed-Sternberg (HRS). LY75 actúa como un receptor endocítico para dirigir los antígenos capturados desde el
- 25 espacio extracelular hasta un compartimiento de procesamiento de antígenos especializado. Causan una reducción de la proliferación de linfocitos B.

La expresión de LY75 ha sido observada en cánceres pancreáticos, de vejiga, de ovario, mamario (incluyendo triple negativo), colorrectal, esofágico, cutáneo, de tiroides y pulmonar (no de células pequeñas) así como también Mieloma múltiple y muchos subtipos diferentes de linfomas (incluyendo DLBCL) y leucemias.

- 5 El anticuerpo anti LY75 puede, en ciertos casos, reaccionar en forma cruzada con el LY75 de especie que no sea humana. Por ejemplo, para facilitar los ensayos clínicos, los anticuerpos anti LY75 pueden reaccionar en forma cruzada con moléculas de LY75 murinas o de primate. Alternativamente, en ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para LY75
- 10 humano y pueden no exhibir reactividad cruzada no humana de especies o de otros tipos.

- La presente invención está relacionada con anticuerpos anti LY75, y en algunas realizaciones con anticuerpos anti CD20, generalmente anticuerpos terapéuticos según lo descrito en este documento. Los anticuerpos que son útiles en la
- 15 presente invención pueden adoptar una cantidad de formatos según lo descrito en este documento, incluyendo anticuerpos tradicionales así como también derivados, fragmentos y miméticos de anticuerpos, descritos más adelante. En una realización, la invención proporciona estructuras de anticuerpos que contienen un conjunto de 6 CDRs según lo definido en esta invención (incluyendo
- 20 cantidades pequeñas de cambios de aminoácidos según lo descrito más adelante).

- “Anticuerpo” en el presente contexto incluye una amplia variedad de estructuras, como será apreciado por aquellos en la técnica, que en algunas realizaciones contienen como mínimo un conjunto de 6 CDRs según lo definido en esta
- 25 invención; incluyendo, meramente a título enunciativo a los anticuerpos tradicionales (incluyendo tanto a los anticuerpos monoclonales como a los policlonales), anticuerpos humanizados y /o quiméricos, fragmentos de

anticuerpos, anticuerpos modificados por ingeniería genética (por ej., con modificaciones de aminoácidos según lo expuesto más adelante), anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos biespecíficos), y otros análogos conocidos en la técnica.

- 5 Las unidades estructurales de los anticuerpos tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto en general por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (típicamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una
- 10 cadena "pesada" (en general con un peso molecular de aproximadamente 50–70 kDa). Las cadenas ligeras humanas son clasificadas como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas son clasificadas como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. IgG tiene diversas subclases, incluyendo, meramente a título enunciativo IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. IgM tiene subclases, incluyendo,
- 15 meramente a título enunciativo, IgM1 e IgM2. Por lo tanto, "isotipo" en el presente contexto quiere decir cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antígenas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE. Debería entenderse que los anticuerpos
- 20 terapéuticos también pueden comprender híbridos de cualquier combinación de isotipos y/o subclases.

En muchas realizaciones, los isotipos de IgG se utilizan en la presente invención, teniendo IgG1 uso particular en una cantidad de aplicaciones.

- La porción terminal amino de cada cadena incluye una región variable de
- 25 aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento antigénico. En la región variable, tres lazos están reunidos para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar un

- sitio de unión al antígeno. Cada uno de los lazos es denominado una región determinante de complementariedad (en adelante denominado una "CDR"), en donde la variación en la secuencia de aminoácidos es más significativa. "Variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de la región variable
- 5 difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos. La variabilidad dentro de la región variable no está distribuida en forma uniforme. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones de estructura (FRs, por sus siglas en inglés) de 15–30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones
- 10 hipervariables" que tienen un largo cada una de 9–15 aminoácidos o más.
- Cada VH y VL está compuesta por tres regiones hipervariables ("regiones determinantes de complementariedad," "CDRs") y cuatro FRs, dispuestas entre el término amino y el término carboxi en el siguiente orden: FR1–CDR1–FR2–CDR2–FR3–CDR3–FR4.
- 15 La región hipervariable generalmente abarca los residuos de aminoácidos entre aproximadamente los residuos de aminoácidos 24–34 (LCDR1; "L" denota cadena ligera), 50–56 (LCDR2) y 89–97 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y alrededor de aproximadamente 31–35B (HCDR1; "H" denota cadena pesada), 50–65 (HCDR2), y 95–102 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada;
- 20 Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o aquellos residuos que forman un lazo hipervariable (por ej. los residuos 26–32 (LCDR1), 50–52 (LCDR2) y 91–96 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y 26–32 (HCDR1), 53–55 (HCDR2) y 96–101 (HCDR3) en la región variable de
- 25 cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901–917. Las CDRs específicas de la invención son descritas más adelante.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se utiliza en general el sistema de numeración de Kabat cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, los residuos 1–107 de la región variable de cadena ligera y los residuos 1–113 de la región variable de cadena pesada) (por ej., Kabat
5 et al., supra (1991)).

Las CDRs contribuyen con la formación del sitio de unión al antígeno, o más específicamente, de unión al epítipo de anticuerpos. El término “epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno al cual una inmunoglobulina o anticuerpo se une de manera específica. Los epítopos pueden
10 ser formados tanto de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegado terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos son típicamente retenidos al exponerse a solventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegado terciario son típicamente perdidos con el tratamiento con solventes
15 desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Según lo descrito en este documento, los métodos para determinar cuáles epítopos son unidos por un determinado anticuerpo (es decir, mapeo de epítopos) son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunoblotting e
20 inmunoprecipitación, donde los péptidos superpuestos o contiguos de LY75 son ensayados para determinar la reactividad con el determinado anticuerpo anti LY75. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítopos incluyen técnicas en el arte y aquellas descritas en esta invención, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional (ver, *por*
25 *ej., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). El término "mapeo de epítopos" se refiere al proceso de

identificación de los determinantes moleculares para el reconocimiento de anticuerpo– antígeno.

La porción de terminal carboxi de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Kabat *et al.* recolectaron

5 numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. En base al grado de conservación de las secuencias, clasificaron secuencias primarias individuales en la CDR y la estructura y realizaron una lista de las mismas (ver *SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST*, 5ta edición, publicación NIH, No. 91–3242, E.A. Kabat *et al.*).

10 En la subclase de IgG de inmunoglobulinas, existen diversos dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Por “dominio de inmunoglobulina (Ig)” en esta invención se quiere decir una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distintiva. De interés en la presente invención son los dominios de cadena pesada, incluyendo, los dominios de cadena pesada constante (CH) y
15 los dominios bisagra. En el contexto de los anticuerpos de IgG, los isotipos de IgG cada uno tiene tres regiones CH. Por consiguiente, dominios “CH” en el contexto de IgG son los siguientes: “CH1” se refiere a las posiciones 118–220 de acuerdo con el índice EU como en Kabat. “CH2” se refiere a las posiciones 237–340 de acuerdo con el índice EU como en Kabat, y “CH3” se refiere a las posiciones 341–
20 447 de acuerdo con el índice EU como en Kabat.

Otro tipo de dominio de Ig de la cadena pesada es la región bisagra. Por “bisagra” o “región bisagra” o “región bisagra del anticuerpo” o “región bisagra de inmunoglobulina” en esta invención se quiere decir el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer dominio constante y el segundo
25 dominio constante de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG comienza en la posición EU de residuo 237. Por lo tanto para IgG la bisagra del anticuerpo es definida en

esta invención como incluyendo las posiciones 221 (D221 en IgG1) hasta 236 (G236 en IgG1), donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra inferior, haciendo referencia en general la “bisagra inferior” a las
5 posiciones 226 o 230.

De particular interés en la presente invención son las regiones Fc. Por “Fc” o “región Fc” o “dominio Fc” en el presente contexto se quiere hacer referencia al polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y en algunos casos, parte
10 de la bisagra. Por ende Fc se refiere a los últimos dos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD, e IgG, los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, el dominio Fc comprende los dominios de inmunoglobulina C γ 2 y C γ 3 (C γ 2 y C γ 3)
15 y la región bisagra inferior entre C γ 1 (C γ 1) y C γ 2 (C γ 2). Si bien los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana es generalmente definida como incluyendo los residuos C226 o P230 a su término carboxilo, donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, como es más completamente descrito más adelante,
20 las modificaciones de aminoácidos son realizadas a la región Fc, por ejemplo para alterar la unión a uno o más receptores Fc γ R o al receptor FcRn.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son de longitud completa. Por “anticuerpo de longitud completa” en esta invención quiere decir la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo regiones
25 variables y constantes, incluyendo una o más modificaciones según lo expuesto en esta invención.

- Alternativamente, los anticuerpos pueden ser una variedad de estructuras, incluyendo, meramente a título enunciativo, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados en esta invención
- 5 “miméticos de anticuerpos”), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (algunas veces denominados “conjugados de anticuerpos”), y fragmentos de cada uno, respectivamente. Las estructuras que se basan en el uso de un conjunto de CDRs están incluidas dentro de la definición de “anticuerpo”.
- 10 En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo específicos incluyen, meramente a título enunciativo, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo único; (iv) el fragmento dAb (Ward *et al.*,
- 15 1989, Nature 341:544–546, enteramente incorporado por referencia) el cual consiste en una región variable única, (v) regiones de CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados (vii) moléculas de Fv de cadena única (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL están ligados por un ligante peptídico el cual permite que los dos
- 20 dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird *et al.*, 1988, Science 242:423–426, Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879–5883, totalmente incorporado por referencia), (viii) Fv de cadena simple biespecífico (WO 03/11161, incorporado a la presente a modo de referencia) y (ix) “diacuerpos” o “triacuerpos”, fragmentos multivalentes o multiespecíficos
- 25 contruidos por fusión de genes (Tomlinson *et al.*, 2000, Methods Enzymol. 326:461–479; WO94/13804; Holliger *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444–6448, todos estos documentos quedan incorporados en su totalidad a

modo de referencia).

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser una mezcla de diferentes especies, por ej. un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. Es decir, en la presente invención, los conjuntos de CDR pueden utilizarse con regiones de estructura y constantes que no sean aquellas específicamente descritas por
5 secuencia en esta invención.

En general, tanto los “anticuerpos quiméricos” como los “anticuerpos humanizados” se refieren a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los “anticuerpos quiméricos” comprenden tradicionalmente
10 región(es) variable(s) de un ratón (o rata, en algunos casos) y la región o regiones constantes de un humano. Los “anticuerpos humanizados” en general se refieren a anticuerpos no humanos que han tenido las regiones de estructura de dominio variable intercambiadas por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. En general, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo entero, excepto las CDRs,
15 es codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a tal anticuerpo excepto dentro de sus CDRs. Las CDRs, algunas o la totalidad de las mismas están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, son injertadas en la estructura de lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad es
20 determinada por las CDRs injertadas. La creación de dichos anticuerpos es descrita en, por ej., WO 92/11018, Jones, 1986, *Nature* 321:522–525, Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534–1536, todos estos documentos quedan incorporados en su totalidad a modo de referencia. La “retromutación” de residuos de estructura aceptores seleccionados a los residuos donadores correspondientes
25 es frecuentemente requerida para obtener nuevamente afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213,

todos estos documentos quedan incorporados en su totalidad a modo de referencia). El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá también por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente aquella de una inmunoglobulina humana, y así comprenderá típicamente una

5 región de Fc humana. Los anticuerpos humanizados también pueden ser generados usando ratones con un sistema inmune manipulado genéticamente. Roque *et al.*, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639–654, incorporado en su totalidad a modo de referencia. Una variedad de técnicas y métodos para humanizar y remodelar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica (Ver

10 Tsurushita & Vasquez, 2004, *Humanization of Monoclonal Antibodies*, *Molecular Biology of B Cells*, 533–545, Elsevier Science (E.E.U.U.), y las referencias citadas en dicho documento, todo incorporado en su totalidad a modo de referencia). Los métodos de humanización incluyen, entre otros, a los métodos descritos en Jones

15 et al., 1986, *Nature* 321:522–525; Riechmann et al., 1988; *Nature* 332:323–329; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534–1536; Queen et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 86:10029–33; He et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 1029–1035; Carter et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci* EE.UU. 89:4285–9, Presta et al., 1997, *Cancer Res.* 57(20):4593–9; Gorman et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 88:4181–4185; O'Connor et al., 1998, *Protein Eng* 11:321–8, todos incorporados

20 en su totalidad a modo de referencia. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir métodos de “resurfacing”, según lo descrito por ejemplo en Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 91:969–973, incorporado en su totalidad a modo de referencia. En una realización, el anticuerpo parental ha

25 sido madurado por afinidad, como es conocido en la técnica. Pueden emplearse métodos basados en estructuras para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo según lo descrito en USSN 11/004,590. Pueden emplearse métodos

basados en selección para humanizar y /o madurar por afinidad regiones variables de anticuerpos, incluyendo meramente a título enunciativo métodos descritos en Wu *et al.*, 1999, *J. Mol. Biol.* 294:151–162; Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678–10684; Rosok *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271(37): 22611–
5 22618; Rader *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95: 8910–8915; Krauss *et al.*, 2003, *Protein Engineering* 16(10):753–759, todos incorporados en su totalidad a modo de referencia. Otros métodos de humanización pueden involucrar el injerto de solo partes de las CDRs, incluyendo meramente a título enunciativo métodos descritos en USSN 09/810.510; Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.*
10 169:1119–1125; De Pascalis *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169:3076–3084, todos incorporados en su totalidad a modo de referencia.

Los anticuerpos divulgados en la presente pueden ser aislados o recombinantes. “Aislados,” cuando se utiliza para describir a los diversos polipéptidos descritos en esta invención, significa un polipéptido que ha sido identificado y separado y/o
15 recuperado de una célula o cultivo celular del cual fue expresado. Por ende, un anticuerpo aislado tiene el propósito de hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antígenas (por ej. un anticuerpo aislado que se une específicamente al LY75 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos
20 que no sean el LY75). Por lo tanto, un anticuerpo “aislado” es aquel encontrado en una forma no normalmente encontrada en la naturaleza (por ej. de presentación no natural). Un anticuerpo aislado según lo definido en esta invención puede incluir, en una realización, por lo menos un aminoácido el cual no se presenta en el anticuerpo de presentación “natural”. Este aminoácido puede
25 ser introducido por medio de una adición o una sustitución. Se entenderá que el aminoácido introducido puede ser un aminoácido de presentación natural o de presentación no natural. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención

son proteínas recombinantes, proteínas aisladas o proteínas sustancialmente puras. Una proteína “aislada” no está acompañada por por lo menos algo del material con el cual se asocia normalmente en su estado natural, por ejemplo constituyendo por lo menos aproximadamente 5%, o por lo menos

5 aproximadamente 50% en peso de la proteína total en una muestra determinada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir entre 5 y 99,9% en peso del contenido proteico total dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, la proteína puede estar hecha a una concentración significativamente más alta a través del uso de un promotor inducible o promotor de expresión elevada, de

10 modo que la proteína es preparada en niveles aumentados de concentración. En el caso de las proteínas recombinantes, la definición incluye la producción de un anticuerpo en una amplia variedad de organismos y/o células huéspedes que son conocidos en la técnica en donde no es producido naturalmente. Comúnmente, un polipéptido aislado será preparado mediante por lo menos un paso de

15 purificación. Un “anticuerpo aislado”, se refiere a un anticuerpo el cual está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antígenas. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a LY75 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos que no son LY75, con la excepción de los anticuerpos que se unen a

20 CD20.

Los anticuerpos monoclonales aislados, que tienen diferentes especificidades, pueden estar combinados en una composición bien definida. Por consiguiente, a modo de ejemplo, el anticuerpo de la invención puede ser opcional e individualmente incluido o excluido en una formulación, según lo descrito

25 adicionalmente más adelante.

Los anticuerpos anti LY75 de la presente invención se unen específicamente a LY75 (por ej. SEC ID NO: 15). Los anticuerpos anti CD20 de la presente invención

se unen específicamente a CD20. La "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un antígeno o un epítipo en particular significa la unión que es mediblemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede ser medida, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula control, la cual en general es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede ser determinada por competición con una molécula control que es similar al objetivo.

La unión específica para un antígeno o un epítipo en particular puede ser exhibida, por ejemplo, mediante un anticuerpo que tiene una K_D para un antígeno o epítipo de por lo menos aproximadamente 10^{-4} M, por lo menos aproximadamente 10^{-5} M, por lo menos aproximadamente 10^{-6} M, por lo menos aproximadamente 10^{-7} M, por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, por lo menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, por lo menos aproximadamente 10^{-12} M, o mayor, donde K_D se refiere a una velocidad de disociación de una interacción anticuerpo – antígeno en particular. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una K_D que es 20–, 50–, 100–, 500–, 1000–, 5,000–, 10,000– o más veces mayor para una molécula control con relación al antígeno o epítipo. Sin embargo, en la presente invención, cuando se administran ADCs de los anticuerpos contra LY75 de la invención, lo importante es que la K_D sea suficiente para dar lugar a la internalización y por consiguiente la muerte celular sin efectos colaterales significativos.

Adicionalmente, la unión específica para un antígeno o un epítipo en particular puede ser exhibida, por ejemplo, mediante un anticuerpo que tiene una K_A o K_a para un antígeno o epítipo de por lo menos 20–, 50–, 100–, 500–, 1000–, 5,000–, 10,000– o más veces superior para el epítipo con relación a un control, donde K_A

o K_a se refiere a una velocidad de asociación de una interacción anticuerpo–antígeno en particular.

Los ensayos estándares para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia LY75 o CD20 pueden ser realizados sobre el nivel proteico o celular y son conocidos en la técnica, incluyendo por ejemplo, ELISAs, Western blots, RIAs, ensayos BIAcore® y análisis de citometría de flujo. Los ensayos adecuados son descritos en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (por ej. afinidad de unión) de los anticuerpos también puede ser evaluada mediante ensayos estándares conocidos en la técnica, tal como por análisis por sistema Biacore®.

10 Para evaluar la unión a células tumorales de células B Raji o Daudi, Raji (Nº de Depósito ATCC CCL–86) o Daudi (Nº de Depósito ATCC CCL–213) las células pueden ser obtenidas de fuentes disponibles para el público, tal como la Recolección Americana de Cultivos Tipificados (“American Type Culture Collection”), y empleadas en ensayos estándares, tal como el análisis de

15 citometría de flujo.

Los anticuerpos LY75 que se unen a LY75 (SEC ID NO: 15) pueden ser internalizados cuando se contactan con células que expresan LY75 sobre la superficie celular. Estos anticuerpos son denominados en esta invención ya sea “anticuerpos anti LY75” o, para facilitar la descripción, “anticuerpos contra LY75”.

20 Ambas expresiones se usan de forma intercambiable en la presente.

Los anticuerpos contra LY75 son internalizados luego del contacto con las células, particularmente células tumorales, las cuales expresan LY75 en la superficie. Es decir, los anticuerpos contra LY75 según lo definido en esta invención que también comprenden conjugados de fármacos son internalizados por las células

25 tumorales, dando como resultado la liberación del fármaco y posterior muerte celular, permitiendo el tratamiento de cánceres que exhiben expresión de LY75. La internalización en este contexto puede ser medida de diversas formas. En una

realización, los anticuerpos LY75 son contactados con las células, tal como una línea celular según lo expuesto en esta invención, utilizando ensayos convencionales tales como MAbZap. Sería claro para el experto que el ensayo MabZap es representativo del efecto que se esperaría ver con un conjugado anticuerpo– fármaco (ADC, por sus siglas en inglés). En este último caso, el ADC
5 sería internalizado, por ende tomando el fármaco en la célula. Un fármaco tóxico tendría la capacidad de matar a la célula, es decir, matar a la célula cancerígena buscada. Los datos de los ensayos MabZap son fácilmente aceptados por los expertos en la técnica como representativos de ensayos de ADC (Kohls, M y
10 Lappi, D., [2000] *Biotechniques*, vol. 28, no. 1, 162–165).

En estas realizaciones de ensayos *in vitro*, los anticuerpos LY75 son agregados, junto con un anticuerpo anti LY75 que comprende una toxina; por ejemplo, el anticuerpo contra LY75 puede ser murino o humanizado y el anticuerpo anti LY75 puede ser anti–murino o anti–humanizado y puede contener una toxina tal como
15 saponina. Luego de la formación del complejo [anticuerpo LY75]–[conjugado anticuerpo anti LY75 – fármaco], el complejo es internalizado y el fármaco (por ej. saponina) es liberado, dando como resultado la muerte celular. Solamente luego de la internalización el fármaco queda liberado, y por ende las células permanecen viables en ausencia de internalización. Según lo expuesto más
20 adelante, sin estar limitado por teoría alguna, en aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti LY75 contiene la toxina, y luego de la internalización, la unión entre el anticuerpo y la toxina queda disociada, liberando la toxina y matando a la célula.

En una realización, el anticuerpo anti LY75 comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena pesada y ligera o regiones variables
25 (VRs) del anticuerpo en particular descrito en esta invención (por ej., denominado en la presente “LY75_A1”). Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo

comprende los dominios CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable (VH) de cadena pesada de anticuerpo LY75_A1 que tiene la secuencia que se muestra en SEC ID NO:1, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable (VL) de cadena ligera del anticuerpo LY75_A1 que tiene la secuencia que se muestra en
5 SEC ID NO:2.

En otra realización, el anticuerpo anti LY75 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una primera vhCDR que comprende SEC ID NO: 5; una segunda vhCDR que comprende SEC ID NO: 6; y una tercera vhCDR que comprende SEC ID NO:7; y una región variable de cadena ligera que comprende
10 una primera vlCDR que comprende SEC ID NO:8; una segunda vlCDR que comprende SEC ID NO: 9; y una tercera vlCDR que comprende SEC ID NO:10.

En otra realización, los anticuerpos anti LY75 de la invención se unen a LY75 humano e incluyen una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEC ID NO: 1, y sus modificaciones
15 conservadoras de secuencia. El anticuerpo puede incluir además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEC ID NO: 2, y sus modificaciones conservadoras de secuencia.

En una realización adicional, los anticuerpos anti LY75 se unen a LY75 humano e incluyen una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena
20 ligera que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NOs:1 y/o 2, respectivamente, y sus modificaciones conservadoras de secuencia.

En el presente contexto, el término modificación conservadora de secuencia se refiere a, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido con un aminoácido que tiene características similares. Es de común conocimiento general para un experto
25 en la técnica cuales de esas sustituciones pueden ser consideradas conservadoras. Otras modificaciones las cuales pueden ser consideradas como modificaciones de secuencia conservadoras incluyen, por ejemplo, la

glicosilación.

Opcionalmente, una o más de las SEQ ID NO: 5-10 independientemente comprenden una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones conservadoras de aminoácidos; opcionalmente, una o más de las SEQ ID NO: 5-10
5 independientemente comprenden una o dos sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Preferentemente, se considera que la expresión “modificaciones de secuencia conservadoras” incluye modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la
10 secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones se pueden introducir en un anticuerpo de la invención por medio de técnicas convencionales conocidas en la técnica, tal como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos
15 son aquellas en las que el residuo aminoácido se reemplaza con un residuo aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina) cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido
20 glutámico) cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina,
25 triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención pueden estar reemplazados con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el

anticuerpo alterado se puede ensayar para determinar la función retenida usando los ensayos funcionales descritos en la presente.

Los anticuerpos aislados los cuales incluyen regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen por lo menos 80%, o por lo menos 85%, o por lo menos 90%, o
5 por lo menos 91%, o por lo menos 92%, o por lo menos 93%, o por lo menos 94%, o por lo menos 95%, o por lo menos 96%, o por lo menos 97%, o por lo menos 98%, o por lo menos 99%, o más identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias mencionadas con anterioridad son también incluidos en la presente invención. Los rangos intermedios a los valores antes mencionados, *por*
10 *ej.*, regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera que tienen por lo menos 80–85%, 85–90%, 90–95% o 95–100% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias mencionadas con anterioridad también se pretende que sean abarcados por la presente invención. En una realización, el anticuerpo anti LY75 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC
15 ID NO:1 o una secuencia que es por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% idéntica a SEC ID NO: 1. En otra realización, el anticuerpo anti LY75 comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID NO:2 o una secuencia que es
20 por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% idéntica a SEC ID NO: 2. En otra realización, el anticuerpo anti LY75 comprende una región de estructura de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90%, por lo
25 menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% idéntica a la estructura de la región variable de cadena pesada de

SEC ID NO: 1 que comprende SEC ID NOs: 16, 17 y 18. En otra realización, el anticuerpo anti LY75 comprende una región de estructura de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% idéntica a la estructura de la región variable de cadena ligera de SEC ID NO:2 que comprende SEC ID NOs:19, 20 y 21.

En una realización, el anticuerpo anti LY75 se denomina en la presente “anticuerpo LY75_A1” y comprende las siguientes CDRs, así como también variantes que contienen una cantidad limitada de variantes de aminoácidos:

A1	SEC ID NOs
variable pesada CDR1	5
variable pesada CDR2	6
variable pesada CDR3	7
variable ligera CDR1	8
variable ligera CDR2	9
variable ligera CDR3	10

En la presente también se divulgan cadenas pesada y ligera variables que comprenden los conjuntos de CDR de la invención, así como también cadenas pesada y ligera de longitud completa (por ej. que comprende regiones constantes también). Como será apreciado por los expertos en la técnica, los conjuntos de CDR del anticuerpo anti LY75 pueden ser incorporados en regiones constantes murinas, humanizadas, o humanas (incluyendo regiones estructurales). Por consiguiente, la presente divulgación proporciona cadenas pesada y ligera variables que son por lo menos aproximadamente 90%–99% idénticas a las SEC IDs descritas en esta invención, con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y 99% todas

útiles en la presente invención.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti LY 75 es uno que compite por la unión a LY 75 humano con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2. Los anticuerpos que compiten por la unión pueden ser identificados usando técnicas de rutina. Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo, el cual muestra la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva es determinada en un ensayo en el cual la inmunoglobulina bajo ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como LY75. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA, por sus siglas en inglés), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA, por sus siglas en inglés), ensayo de competición sándwich (ver Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina– avidina de fase sólida (ver Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo etiquetado directo de fase sólida, ensayo sándwich etiquetado directo de fase sólida (ver Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de etiqueta directa de fase sólido usando etiqueta I-125 (ver Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de biotina– avidina directa de fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); y RIA etiquetado directo. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Típicamente, ese tipo de ensayo involucra el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de éstos, una inmunoglobulina de ensayo no etiquetada y una inmunoglobulina de referencia etiquetada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad

de etiqueta unido a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. En general la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. En general, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, el mismo inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en por lo menos 50–55%, 55–60%, 60–65%, 65–70% 70–75% 75–80% 80–85% 85–90% 90–95% 95–99% o más.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser caracterizados por la unión a LY75 o CD20 usando una variedad de técnicas conocidas. En general, los anticuerpos son inicialmente caracterizados por ELISA. Brevemente, las placas de microtítulo pueden ser recubiertas con LY75 o CD20 purificado en PBS, y luego pueden ser bloqueadas con proteínas irrelevantes tal como albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) diluida en PBS. Las diluciones de plasma de ratones LY75–inmunizados o ratones CD20–inmunizados son agregadas a cada pocillo e incubadas durante 1–2 horas a 37°C. Las placas son lavadas con PBS/Tween 20 y luego incubadas con un reactivo policlonal Fc–específico de IgG de cabra anti–humana conjugado a fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, las placas son desarrolladas con sustrato ABTS, y analizadas a OD de 405. Preferentemente, los ratones que desarrollan los títulos más altos serán empleados para las fusiones.

Un ensayo ELISA según lo descrito con anterioridad puede ser utilizado para seleccionar anticuerpos y, por ende, hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con el inmunógeno de LY75/CD20. Los hibridomas que se unen, preferentemente con alta afinidad, al LY75/CD20 pueden ser luego subclonados y adicionalmente caracterizados. Un clon de cada hibridoma, el cual retiene la reactividad de las células parentales (mediante ELISA), puede ser luego elegido para preparar un banco de células, y para la purificación de anticuerpos. Para purificar los anticuerpos anti LY75 o anti CD20, los hibridomas

seleccionados pueden ser cultivados en botellas de cultivo rotatorias, frascos giratorios de dos litros u otros sistemas de cultivo. Los sobrenadantes pueden ser filtrados y concentrados antes de la cromatografía por afinidad con proteína A–Sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ) para purificar la proteína. Luego del
5 intercambio del buffer a PBS, la concentración puede ser determinada mediante OD₂₈₀ usando coeficiente de extinción 1.43 o preferentemente por análisis nefelométrico. IgG puede ser controlada por electroforesis en gel y por el método específico del antígeno.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti LY75 o anti CD20
10 seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo puede ser biotinilado usando reactivos disponibles en el mercado (Pierce, Rockford, IL). La unión de MAb biotinilado puede ser detectada con una sonda etiquetada con estreptavidina. Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se pueden realizar ELISAs de isotipo usando técnicas reconocidas en el campo. Por
15 ejemplo, los pocillos de placas de microtítulo pueden ser recubiertos con 10 µg/ml de anti–Ig durante toda la noche a 4°C. Luego del bloqueo con 5% BSA, las placas se hacen reaccionar con 10 µg/ml de anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. Luego, los pocillos pueden hacerse reaccionar con ya sea IgG1 o con otras sondas
20 conjugadas específicas para el isotipo. Las placas son desarrolladas y analizadas según lo descrito con anterioridad.

Para ensayar la unión de los anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan LY75 o CD20, se puede emplear citometría de flujo. Brevemente, las líneas celulares y/o PBMCs humanos que expresan LY75 o CD20 unido a
25 membrana (cultivado bajo condiciones de cultivo estándares) se mezclan con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene 0,1% BSA a 4°C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen

reaccionar con anticuerpo anti- IgG etiquetado con fluoresceína bajo las mismas condiciones que la coloración de anticuerpo primaria. Las muestras pueden ser analizadas mediante un instrumento FACScan usando propiedades de dispersión luminosa y lateral para puentear células únicas y se determina la unión de los anticuerpos etiquetados. Un ensayo alternativo utilizando microscopía de fluorescencia puede ser utilizado (además de o en lugar del) ensayo de citometría de flujo. Las células pueden ser coloreadas exactamente según lo descrito con anterioridad y examinadas por microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, aunque puede tener sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

Las IgGs anti LY75 pueden ser adicionalmente ensayadas para determinar la reactividad con el antígeno LY75 mediante Western blotting; al igual que con los anticuerpos anti CD20. Brevemente, los extractos celulares de células que expresan LY75/CD20 pueden ser preparados y sometidos a electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico poliacrilamida. Luego de la electroforesis, los antígenos separados serán transferidos a membranas de nitrocelulosa, bloqueados con 20% suero de ratón, y sondeados con los anticuerpos monoclonales a ser ensayados. La unión de IgG puede ser detectada usando fosfatasa alcalina anti- IgG y puede ser desarrollada con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Los métodos para analizar la afinidad de unión, reactividad cruzada, y cinética de unión de diversos anticuerpos anti LY75 incluyen ensayos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) Biacore™ usando un instrumento de SPR Biacore™ 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia).

En una realización, el anticuerpo se une específicamente a LY75 humano que comprende SEC ID NO: 15). Preferentemente, el anticuerpo anti LY75 se une a

LY75 humano con alta afinidad.

Preferentemente, el anticuerpo anti LY75 se une a una proteína LY75 con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une a una proteína LY75 con una K_D de 2×10^{-8} M o menos, se une a una proteína LY75 con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, se une a una proteína LY75 con una K_D de 4×10^{-9} M o menos, se une a una proteína LY75 con una K_D de 3×10^{-9} M o menos, se une a una proteína LY75 con una K_D de 2×10^{-9} M o menos, se une a una proteína LY75 con una K_D de 1×10^{-9} M o menos, se une a una proteína LY75 con una K_D de 5×10^{-10} M o menos, o se une a una proteína LY75 con una K_D de 1×10^{-10} M o menos.

En una realización, los anticuerpos anti LY75 compiten (por ej., compiten en forma cruzada) por la unión a LY75 con los anticuerpos anti LY75 particulares descritos en esta invención (por ej., LY75_A1). Dichos anticuerpos competitivos pueden ser identificados en base a su capacidad de inhibir competitivamente la unión a LY75 de uno o más de mAbs en ensayos de unión a LY75 convencionales. Por ejemplo, los ensayos ELISA convencionales pueden ser utilizados en los cuales una proteína LY75 humana recombinante es inmovilizada en la placa, uno de los anticuerpos es etiquetado fluorescentemente y se evalúa la capacidad de los anticuerpos no etiquetados para competir con la unión del anticuerpo etiquetado. Adicional o alternativamente, se puede emplear el análisis BIAcore para evaluar la capacidad de los anticuerpos de competir en forma cruzada. La capacidad de un anticuerpo de ensayo de inhibir la unión de un anticuerpo anti LY75 de la invención a LY75 humano demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con el anticuerpo por la unión a LY75 humano.

En una realización, el anticuerpo competitivo es un anticuerpo que se une al mismo epítipo en LY75 humano que los anticuerpos monoclonales anti LY75 particulares descritos en esta invención (por ej., LY75_A1). Se pueden emplear técnicas convencionales de mapeo de epítopos, tales como cristalografía de rayos

x y resonancia magnética nuclear bidimensional, para determinar si un anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia (ver, por ej., *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

- 5 En una realización, el anticuerpo que compite por la unión a LY75 y/o se une al mismo epítipo en LY75 humano es un anticuerpo humano.

- Una vez que un mAb anti LY75 arquetípico, único ha sido aislado que tiene las propiedades deseadas descritas en esta invención, otros mAbs con propiedades similares, por ej., que tienen el mismo epítipo pueden ser generados. Por
- 10 ejemplo, los ratones pueden ser inmunizados con LY75 según lo descrito en este documento, hibridomas pueden ser producidos, y los mAbs resultantes pueden ser seleccionados por la capacidad de competir con el mAb arquetípico por la unión a LY75. Los ratones también pueden ser inmunizados con un fragmento más pequeño de LY75 que contiene el epítipo al cual se une el mAb arquetípico.
 - 15 El epítipo puede ser localizado por, por ej., selección para la unión a una serie de péptidos superpuestos que abarcan a LY75. Alternativamente, el método de Jaspers et al., *Biotechnology* 12:899, 1994 puede utilizarse para guiar la selección de mAbs que tienen el mismo epítipo y por ende propiedades similares al mAb arquetípico. Usando exhibición de fagos, primero la cadena pesada del anticuerpo
 - 20 arquetípico se aparea con un repertorio de cadenas ligeras (preferentemente humanas) para seleccionar un mAb de unión a LY75, y luego la nueva cadena ligera se aparea con un repertorio de cadenas pesadas (preferentemente humanas) para seleccionar un mAb de unión a LY75 (preferentemente humano) que tiene el mismo epítipo que el mAb arquetípico. Alternativamente, pueden
 - 25 obtener variantes del mAb arquetípico por mutagénesis de ADNc que codifica las cadenas pesada y ligera del anticuerpo.

Para evaluar el nivel de competición entre dos anticuerpos pueden utilizarse, por

- ejemplo, radioinmunoensayos o ensayos que utilizan otras etiquetas para los anticuerpos. Por ejemplo, un antígeno LY75 puede ser incubado con una cantidad de saturación de un primer anticuerpo anti LY75 o su fragmento de unión al antígeno conjugado a un compuesto etiquetado (por ej., ^3H , ^{125}I , biotina, o rubidio)
- 5 en presencia de la misma cantidad de un segundo anticuerpo anti LY75 sin etiquetar. La cantidad de anticuerpo etiquetado que es unido al antígeno en presencia del anticuerpo de bloqueo no etiquetado es luego evaluada y comparada con la unión en ausencia del anticuerpo de bloqueo sin etiquetar. La competición se determina por el porcentaje de cambio en las señales de unión en
- 10 presencia del anticuerpo de bloqueo sin etiquetar en comparación con la ausencia del anticuerpo de bloqueo. Por lo tanto, si existe una inhibición del 50% de la unión del anticuerpo etiquetado en presencia del anticuerpo de bloqueo en comparación con la unión en ausencia del anticuerpo de bloqueo, entonces existe competición entre los dos anticuerpos del 50%. Por lo tanto, la referencia a la
- 15 competición entre un primer y un segundo anticuerpo de 50% o más, 60% o más, 70% o más, tal como 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, significa que el primer anticuerpo inhibe la unión del segundo anticuerpo (o vice versa) al antígeno en 50%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más (en
- 20 comparación con la unión del antígeno por el segundo anticuerpo en ausencia del primer anticuerpo). Por lo tanto, la inhibición de la unión de un primer anticuerpo a un antígeno por un segundo anticuerpo de 50%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más indica que los dos anticuerpos se unen al mismo epítipo.
- 25 En algunas realizaciones, el componente (B) de la combinación farmacéutica es un anticuerpo anti CD20 como se definió en la presente.
- El antígeno de linfocitos B CD20 o CD20 es una fosfoproteína activada glicosilada

expresada en la superficie de todas las células B al comienzo de la fase pro B (CD45R+, CD117+) y aumenta progresivamente la concentración hasta la maduración (Hardy, Richard (2008). “*Chapter 7: B Lymphocyte Development and Biology*”. En Paul, William. *Fundamental Immunology* (Libro) (6ta. Ed.)

5 Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 237-269. ISBN 0-7817-6519-6).

CD20 se expresa en todas las etapas del desarrollo de células B excepto en la primera y la última; está presente a partir de células pro-B tardías a través de células de memoria, pero no en células pro-B tempranas ni en ráfagas de plasma ni células plasmáticas. Se encuentra en linfomas de células B, leucemia de
10 células pilosas, leucemia linfocítica crónica de células B, y células madre de melanoma. La expresión de CD20 está regulada por la señalización de quimiocinas a través del eje CXCR4/SDF1.

Se puede usar la inmunohistoquímica para determinar la presencia de CD20 en células en secciones histológicas tisulares.

15 En los seres humanos, CD20 está codificada por el gen MS4A1. Este gen codifica un miembro de la familia de genes transmembrana 4A.

En una realización, el componente (B) de la combinación farmacéutica comprende un anticuerpo anti CD20, o una porción de unión al antígeno de este, dicho anticuerpo comprende:

20 a) una región variable de cadena pesada que comprende:

- i) una primera vhCDR que comprende SEQ ID NO: 40;
- ii) una segunda vhCDR que comprende SEQ ID NO: 41; y
- iii) una tercera vhCDR que comprende SEQ ID NO: 42; y

b) una región variable de cadena ligera que comprende:

- 25 i) una primera vlCDR que comprende SEQ ID NO: 43;
- ii) una segunda vlCDR que comprende SEQ ID NO: 44; y
- iii) una tercera vlCDR que comprende SEQ ID NO: 45;

opcionalmente donde una cualquiera o varias de las SEQ ID NO mencionadas comprende independientemente una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos.

Opcionalmente, una o más de las SEQ ID NO: 40-45 mencionadas anteriormente
5 comprenden independientemente una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones conservadoras de aminoácidos; más preferentemente, una cualquiera o varias de las secuencias SEQ ID NO: mencionadas comprende independientemente una o dos sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Preferentemente, el anticuerpo anti CD20 es un anticuerpo monoclonal, más
10 preferentemente un anticuerpo monoclonal humano, y aún más preferentemente un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humano.

En una realización particularmente preferida de la invención, el anticuerpo anti CD20 es Rituximab.

Rituximab es un anticuerpo monoclonal contra la proteína CD20 que se expresa
15 ampliamente en las células B (Oncogene (20 de octubre de 2003), Smith MR, "Rituximab (anticuerpo monoclonal anti CD20): mechanisms of action and resistance", 22(47):7359-68). Rituximab destruye las células B normales y malignas que tienen CD20 en su superficie y por lo tanto se usa para tratar enfermedades que se caracterizan por tener muchas células B, células B
20 hiperactivas o células B disfuncionales. Rituximab se ha usado previamente para tratar una cantidad de enfermedades autoinmunes y algunos tipos de cáncer, inclusive, artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica idiopática, pénfigo vulgar, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, linfoma no Hodgink, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, leucemia linfocítica crónica y
25 anemias autoinmunes. Rituximab se vende con el nombre comercial Rituxan® de Roche.

Preferentemente, la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo rituximab comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEQ ID NO: 38 y 39, respectivamente.

La presente invención abarca anticuerpos variantes, algunas veces denominados “derivados de anticuerpos” o “análogos de anticuerpos” también. Es decir, existen una cantidad de modificaciones que se pueden realizar a los anticuerpos divulgados en la presente, incluyendo, meramente a título enunciativo, modificaciones de aminoácidos en las CDRs (maduración por afinidad), modificaciones de aminoácidos en las regiones estructurales, modificaciones de aminoácidos en la región Fc, variantes de la glicosilación, modificaciones covalentes de otros tipos (por ej. para la adhesión de conjugados de fármacos, etc.).

Por “variante” en esta invención se quiere decir una secuencia polipeptídica que difiere de aquella de un polipéptido parental en virtud de por lo menos una modificación de aminoácidos. En este caso, el polipéptido parental es las cadenas pesada o ligera variables de longitud completa, por ejemplo, como se enumeran en SEC ID NOs: 1 o 2, respectivamente o las regiones CDR o las regiones estructurales de las cadenas pesada y ligera enlistadas en SEC ID NOs 5–10 y 16–21 para LY75. Las modificaciones de aminoácidos pueden incluir sustituciones, inserciones y deleciones, prefiriéndose las primeras en muchos casos. Se entenderá que una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservadora o no conservadora prefiriéndose las sustituciones conservadoras. Adicionalmente dicha sustitución puede ser una sustitución con ya sea un aminoácido de presentación natural o no natural.

En general, las variantes pueden incluir cualquier cantidad de modificaciones, siempre y cuando la función del anticuerpo esté aun presente, según lo descrito en este documento. Es decir, LY75_A1, por ejemplo, el anticuerpo debería aún

unirse específicamente a LY75 humano. Similarmente, los anticuerpos anti CD20 se deberían unir específicamente a CD20 humano. Si se generan las variantes de aminoácidos con la región Fc, por ejemplo, los anticuerpos variantes deberían mantener las funciones requeridas de unión al receptor para la aplicación o
5 indicación en particular del anticuerpo.

Las “variantes” en este caso pueden prepararse en las secuencias de CDR enlistadas, las regiones estructurales o Fc del anticuerpo.

Sin embargo, en general, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos son generalmente utilizadas ya que a menudo el objetivo consiste en
10 alterar la función con una cantidad mínima de modificaciones. En algunos casos, existen entre 1 y 5 modificaciones (por ej. sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos individuales), siendo útiles entre 1–2, 1–3 y 1–4 también en muchas realizaciones. La cantidad de modificaciones puede depender del tamaño de la región que se está modificando; por ejemplo, en general, se desean
15 cantidades menores de modificaciones en las regiones CDR. El experto en la técnica comprenderá que incluso dentro de las regiones CDR la ubicación de la modificación puede alterar significativamente el efecto. En una realización, las modificaciones pueden ser realizadas en cualquiera de CDR1, CDR2 o CDR3 de las cadenas pesada y/o ligera. En una realización adicional, las modificaciones
20 son realizadas en cualquiera de CDR1 o CDR2 de las cadenas pesada y/o ligera. En aún otra realización, las modificaciones están situadas en CDR1 de las cadenas pesada y/o ligera.

Debería señalarse que la cantidad de modificaciones de aminoácidos puede estar dentro de dominios funcionales: por ejemplo, puede ser deseable tener entre 1–5
25 modificaciones en la región Fc de proteínas tipo salvaje o modificadas por ingeniería genética, así como también entre 1 y 5 modificaciones en la región Fv, por ejemplo. Una secuencia de polipéptido variante poseerá preferentemente por

lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con las secuencias parentales (por ej. las regiones variables, las regiones constantes, y/o las secuencias de cadena pesada y ligera y /o las CDRs de LY75_A1 o Rtixumab). Debería señalarse que dependiendo del
 5 tamaño de la secuencia, el porcentaje de identidad dependerá de la cantidad de aminoácidos.

Mediante “sustitución de aminoácidos” o “sustitución” en esta invención se quiere decir el reemplazo de un aminoácido en una posición en particular en una secuencia polipeptídica parental con otro aminoácido el cual puede ser un
 10 aminoácido natural o de presentación no natural. Por ejemplo, la sustitución S100A se refiere a un polipéptido variante en el cual la serina en posición 100 es reemplazada con alanina. Por “inserción de aminoácidos” o “inserción” en el presente contexto se quiere decir la adición de un aminoácido en una posición en particular en una secuencia polipeptídica parental. Por “deleción de aminoácidos”
 15 o “deleción” en el presente contexto se quiere decir la remoción de un aminoácido en una posición en particular en una secuencia polipeptídica parental.

Por “polipéptido parental”, “proteína parental”, “polipéptido precursor”, o “proteína precursora” en el presente contexto se quiere significar un polipéptido no modificado que es posteriormente modificado para generar una variante. En
 20 general, los polipéptidos parentales en esta invención son LY75_A1 y Rituximab. Por consiguiente, por “anticuerpo parental” en el presente contexto se quiere significar un anticuerpo que es modificado para generar un anticuerpo variante.

Por “tipo salvaje” o “WT (por sus siglas en inglés)” o “nativo” en esta invención se quiere significar una secuencia de aminoácidos o una secuencia nucleotídica que
 25 es encontrada en la naturaleza, incluyendo las variaciones alélicas. Una proteína WT, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG, etc. tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia nucleotídica que no ha sido intencionalmente

modificada.

Por "región Fc variante" en esta invención se quiere significar una secuencia Fc que difiere de aquella de una secuencia Fc del tipo salvaje en virtud de por lo menos una modificación de aminoácidos. La variante Fc puede hacer referencia al
 5 polipéptido Fc mismo, a las composiciones que comprenden el polipéptido variante Fc, o a la secuencia de aminoácidos.

En algunas realizaciones, se realizan una o más modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDRs de LY75_A1 o Rituximab. En general, solamente 1 o 2 o 3 aminoácidos son sustituidos en cualquier CDR simple, y generalmente no se
 10 realizan más de entre 4, 5, 6, 7, 8 9 o 10 cambios dentro de un conjunto de 6 CDRs. Sin embargo, debería apreciarse que cualquier combinación de no sustituciones, 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier CDR puede combinarse independiente y opcionalmente con cualquier otra sustitución. Será evidente que las sustituciones pueden ser realizadas en cualquiera de las 6 CDRs. En una
 15 realización, las sustituciones son realizadas en CDR1 de las cadenas pesada y/o ligera.

En algunos casos, las modificaciones de aminoácidos en las CDRs son denominadas "maduración por afinidad". Un anticuerpo "madurado por afinidad" es aquel que tiene una o más alteraciones en una o más CDRs lo cual da como
 20 resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental el cual no posee esas alteraciones. En algunos casos, si bien raros, puede ser deseable reducir la afinidad de un anticuerpo a su antígeno, pero este caso no es generalmente preferido.

La maduración por afinidad puede realizarse para incrementar la afinidad de unión
 25 del anticuerpo para el antígeno en por lo menos aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%,

- aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 100%, aproximadamente 110%, aproximadamente 120%, aproximadamente 130%, aproximadamente 140%, aproximadamente 150% o más, o 1, 2, 3, 4 hasta 5 veces en comparación con el anticuerpo “parental”. Los anticuerpos madurados
- 5 por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad son producidos mediante procedimientos conocidos. Ver, por ejemplo, Marks *et al.*, 1992, *Biotechnology* 10:779–783 que describe la maduración por afinidad mediante barajado de dominios de cadena variable pesada (VH) y variable ligera (VL). La
- 10 mutagénesis al azar de CDR y/o residuos estructurales se describe en: Barbas, *et al.* 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, EE.UU. 91:3809–3813; Shier *et al.*, 1995, *Gene* 169:147–155; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 155:1994–2004; Jackson *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310–9; and Hawkins *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 226:889–896, por ejemplo.
- 15 Alternativamente, se pueden realizar modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDRs de los anticuerpos de la invención que son “silenciosas”, por ej. que no alteran significativamente la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Éstas pueden realizarse por una cantidad de razones, incluyendo optimización de la expresión (como puede realizarse para los ácidos nucleicos que codifican los
- 20 anticuerpos de la invención).
- Por lo tanto, se incluyen dentro de la definición de las CDRs y de los anticuerpos divulgados en la presente a las CDRs y anticuerpos variantes; es decir, los anticuerpos pueden incluir modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDRs de LY75_A1 o Rituximab. Por añadidura, según lo expuesto más adelante,
- 25 las modificaciones de aminoácidos también pueden ser realizadas independiente y opcionalmente en cualquier región fuera de las CDRs, incluyendo las regiones estructurales y constantes según lo descrito en este documento.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti LY75 y/o los anticuerpos anti CD20 divulgados en la presente están compuestos por un dominio Fc variante. Como es conocido en la técnica, la región Fc de un anticuerpo interactúa con una cantidad de receptores y ligandos Fc, impartiendo una variedad de capacidades funcionales importantes denominadas funciones efectoras. Estos receptores Fc incluyen, meramente a título enunciativo, (en humanos) FcγRI (CD64) incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158, correlacionados con la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2), FcRn (el receptor neonatal), C1q (proteína complementaria involucrada en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)) y FcRn (el receptor neonatal involucrado en la semivida sérica). Se pueden realizar modificaciones adecuadas en una o más posiciones como es generalmente expuesto, por ejemplo en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 11/841.654 y en las referencias citadas en dicho documento, US 2004/013210, US 2005/0054832, US 2006/0024298, US 2006/0121032, US 2006/0235208, US 2007/0148170, USSN 12/341.769, Patente Estadounidense No. 6.737.056, Patente Estadounidense No. 7.670.600, Patente Estadounidense No. 6.086.875 todos estos documentos quedan expresamente incorporados a modo de referencia en su totalidad, y en particular para sustituciones de aminoácidos específicas que aumentan la unión a los receptores Fc.

Además de las modificaciones expuestas con anterioridad, se pueden realizar otras modificaciones. Por ejemplo, las moléculas pueden ser estabilizadas mediante la incorporación de puentes disulfuro que ligan los dominios VH y VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245, incorporado en su totalidad a

modo de referencia).

Por añadidura, las modificaciones en cisteínas son particularmente útiles en aplicaciones de conjugados anticuerpo– fármaco (ADC), descritas adicionalmente más adelante. En algunas realizaciones, la región constante de los anticuerpos
 5 puede ser modificada por ingeniería genética para contener una o más cisteínas que son particularmente “tiol reactivas”, de modo de permitir una colocación más específica y controlada del resto de fármaco. Ver por ejemplo la Patente estadounidense No. 7.521.541, incorporada a modo de referencia en su totalidad a la presente invención.

10 Adicionalmente, existe una variedad de modificaciones covalentes de anticuerpos que se pueden realizar según lo expuesto más adelante.

Las modificaciones covalentes de anticuerpos están incluidas dentro del alcance de esta invención, y son en general, aunque no siempre, realizadas de manera pos–traducción. Por ejemplo, diversos tipos de modificaciones covalentes del
 15 anticuerpo son introducidos en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos de terminal N o C.

Los residuos cisteinilo más comúnmente se hacen reaccionar con α –haloacetatos
 20 (y aminas correspondientes), tal como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo también pueden ser derivados mediante reacción con bromotri fluoracetona, ácido α –bromo– β –(5–imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N–alquilmaleimidas, disulfuro de 3–nitro–2–piridilo, 2–piridil disulfuro de metilo, p–
 25 cloromercuribenzoato, 2–cloromercuri–4–nitrofenol, o cloro–7–nitrobenzo–2–oxa–1,3–diazol y similares.

Los residuos histidilo son derivados mediante reacción con dietilpirocarbonato a

pH 5.5–7.0 puesto que este agente es relativamente específico para la cadena lateral del histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo es también útil; la reacción se lleva a cabo preferentemente en cacodilato sódico 0,1M a pH 6.0.

Los residuos terminales lisinilo y amino se hacen reaccionar con anhídridos del
 5 ácido succínico y otros ácidos carboxílico. La derivación con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencensulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentandiona; y reacción catalizada
 10 por transaminasa con glioxilato.

Los residuos arginilo son modificados mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butandiona, 1,2-ciclohexandiona, y ninhidrina. La derivación de residuos arginina requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas debido al elevado pKa del grupo
 15 funcional de guanidina. Adicionalmente, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como también con el grupo épsilon-amino de arginina.

La modificación específica de residuos tirosilo puede efectuarse, con particular interés en la introducción de etiquetas espectrales en residuos tirosilo mediante reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más
 20 comúnmente, N-acetilimidizol y tetranitrometano son utilizados para formar especies de O-acetil tirosilo y 3-nitro derivados, respectivamente. Los residuos tirosilo son yodados usando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas etiquetadas para utilizar en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de cloramina T descrito anteriormente.

25 Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) son selectivamente modificados mediante reacción con carbodiimidas ($\text{R}'\text{—N}=\text{C}=\text{N—R}'$), donde R y R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-

morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Adicionalmente, los residuos aspartilo y glutamilo son convertidos en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

- La derivación con agentes bifuncionales es útil para el entrecruzamiento de anticuerpos con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para utilizar en una variedad de métodos, además de los métodos descritos más adelante. Los agentes entrecruzadores comúnmente utilizados incluyen, por ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes de derivación tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propiomidato proporcionan intermediarios fotoactivables que son capaces de formar entrecruzamientos en presencia de luz. Alternativamente, las matrices insolubles en agua reactivas tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las Pat. de los Estados Unidos Nos. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440, todos incorporados en su totalidad a modo de referencia, se emplean para la inmovilización proteica.
- Los residuos glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente desamidados a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente. Alternativamente, estos residuos se desamidán bajo condiciones moderadamente ácidas. Cualquier forma de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención.
- Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina (T. E. Creighton, *Proteins*:

Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79–86 [1983], incorporados en su totalidad a modo de referencia), acetilación de la amina N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo de C-terminal.

Además, como será apreciado por los expertos en la técnica, las etiquetas (incluyendo fluorescentes, enzimáticas, magnéticas, radioactivas, etc. pueden todas ser agregadas a los anticuerpos (como así también las otras composiciones de la invención).

Otro tipo de modificación covalente es alteraciones en la glicosilación. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta invención pueden ser total o parcialmente aglicosilados, por ejemplo, afucosilados.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la ligación del anticuerpo a diversos polímeros no proteináceos, incluyendo, meramente a título enunciativo, diversos polioles tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, del modo expuesto en, por ejemplo, 2005–2006 PEG Catálogo de Nektar Therapeutics (disponible en el sitio de internet Nektar) Patentes de los Estados Unidos N° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337, todos incorporados en su totalidad a modo de referencia. Por añadidura, como es conocido en la técnica, las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en diversas posiciones dentro del anticuerpo para facilitar la adición de los polímeros tales como PEG. Ver por ejemplo, la Publicación de los Estados Unidos de América No. 2005/0114037A1, incorporada en su totalidad a modo de referencia.

En realizaciones adicionales, los anticuerpos pueden comprender una etiqueta. Por “etiquetado” en esta invención se quiere significar que un compuesto tiene por lo menos un elemento, isótopo o compuesto químico unido para permitir la detección del compuesto. En general, las etiquetas caen en tres clases: a) etiquetas isotópicas, las cuales pueden ser radiactivas o isótopos pesados; b)

magnéticas, eléctricas, térmicas; y c) colorantes de color o luminiscentes; si bien las etiquetas incluyen enzimas y partículas tales como partículas magnéticas también. Las etiquetas preferidas incluyen, meramente a título enunciativo, complejos de lantánido fluorescentes (incluyendo aquellos de Europio y Terbio), y

5 etiquetas fluorescentes incluyendo, meramente a título enunciativo, puntos cuánticos, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde Malacite, estilbeno, Amarillo Lucifer, Azul Cascade, Rojo Texas, los colorantes Alexa, los colorantes Cy, y otros descritos en la sexta Edición del Molecular Probes Handbook por Richard P.

10 Haugland, expresamente incorporado a la presente a modo de referencia.

Conjugados Anticuerpo-Fármaco

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti LY75 divulgados en la presente son conjugados con fármacos para formar conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs).

15 En general, los ADCs se utilizan en aplicaciones de oncología, donde el uso de conjugados anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos y citostáticos permite la administración dirigida del resto farmacológico a los tumores, lo cual puede permitir una mayor eficacia, menor toxicidad, etc. Una reseña de esta tecnología es proporcionada en Ducry *et al.*, *Bioconjugate Chem.*,

20 21:5–13 (2010), Carter *et al.*, *Cancer J.* 14(3):154 (2008) y Senter, *Current Opin. Chem. Biol.* 13:235–244 (2009), todos ellos incorporados a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Por lo tanto la invención proporciona combinaciones farmacéuticas que comprenden, *inter alia*, anticuerpos anti LY75 conjugados a fármacos. En general,

25 la conjugación se realiza por la unión covalente al anticuerpo, según lo descrito adicionalmente en lo que sigue, y en general se basa en un ligante, a menudo una ligación peptídica (la cual, según lo descrito más adelante, puede ser diseñada

para ser sensible a la disociación por proteasas en el sitio objetivo o no). Adicionalmente, según lo descrito con anterioridad, la ligación de la unión ligante-fármaco (LU-D, por sus siglas en inglés) puede realizarse por la unión a cisteínas dentro del anticuerpo. Como será apreciado por los expertos en la técnica, la cantidad de restos farmacológicos por cada anticuerpo puede cambiar, dependiendo de las condiciones de la reacción, y puede variar entre 1:1 y 10:1 fármaco: anticuerpo. Como será apreciado por los expertos en la técnica, la cantidad real es un promedio.

Por ende, los anticuerpos anti LY75 pueden ser conjugados a fármacos. Según lo descrito más adelante, el fármaco del ADC puede ser cualquier cantidad de agentes, incluyendo meramente a título enunciativo agentes citotóxicos tales como agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado) se proporcionan. En otras realizaciones, la invención proporciona además métodos para el uso de los ADCs.

Los fármacos para utilizar en la presente invención incluyen fármacos citotóxicos, particularmente aquellos que se utilizan para la terapia contra el cáncer. Dichos fármacos incluyen, in general, agentes que dañan el ADN, anti-metabolitos, productos naturales y sus análogos. Las clases ejemplares de agentes citotóxicos incluyen los inhibidores enzimáticos tales como inhibidores de la dihidrofolato reductasa, e inhibidores de la timidilato sintasa, intercaladores del ADN, disociadores del ADN, inhibidores de la topoisomerasa, la familia de fármacos de antraciclina, los fármacos de la vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, la familia de fármacos de las pteridinas, diinenos, las podofilotoxinas, dolastatinas, maitansinoides, inductores de la diferenciación, y los taxoles.

Los miembros de estas clases incluyen, por ejemplo, taxol, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, citosina arabinósido, melfalan, leurosina, leurosideína, actinomicina, daunorubicina, doxorubicina, mitomicina C, mitomicina A, caminomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina y derivados de la podofilotoxina tales como etopósido o fosfato de etopósido, vinblastina, vincristina, vindesina, taxanos incluyendo taxol, ácido taxotere retinoico, ácido butírico, N8-acetil espermidina, camptotecina, calicheamicina, esperamicina, eno-diinos, duocarmicina A, duocarmicina SA, calicheamicina, camptotecina, hemiasterlinas, maitansinoides (incluyendo DM1), monometilauristatina E (MMAE), monometilauristatina F (MMAF), y maitansinoides (DM4) y sus análogos.

Las toxinas pueden utilizarse como conjugados anticuerpo- toxina e incluyen toxinas bacterianas tales como toxina de difteria, toxinas de plantas tales como ricina, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina (Mandler *et al* (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573–1581; Mandler *et al* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025–1028; Mandler *et al* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786–791), maitansinoides (EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93:8618–8623), y calicheamicina (Lode *et al* (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al* (1993) *Cancer Res.* 53:3336–3342), hemiasterlinas (WO2004/026293; Zask *et al.*, (2004) *J. Med. Chem.* 47: 4774–4786). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, unión al ADN, o inhibición de la topoisomerasa.

Los conjugados de un anticuerpo anti LY75 y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno, calicheamicina, duocarmicinas, pirrolobenzodiazepinas y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también pueden utilizarse.

Preferentemente, el anticuerpo anti LY75 se conjuga a DM1 o DM4, más

preferentemente a DM4. Los compuestos de maitansina adecuados para utilizar como restos de fármaco maitansinoides son bien conocidos en la técnica, y pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos, producidos usando técnicas de ingeniería genética (ver Yu et al (2002) PNAS 99:7968–7973), o maitansinol y análogos de maitansinol preparados sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos. Según lo descrito más adelante, los fármacos pueden ser modificados mediante la incorporación de un grupo funcionalmente activo tal como un grupo tiol o amina para la conjugación al anticuerpo.

- 10 Los restos de fármaco maitansinoide ejemplares incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado, tal como: C–19–decloro (Pat. de los Estados Unidos de América No. 4.256.746) (preparado mediante reducción de hidruro de litio y aluminio de ansamitocina P2); C–20–hidroxi (o C–20–demetil) +/-C–19–decloro (Pat. de los Estados Unidos de América Nos. 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y C–20–demetoxi, C–20–aciloxi (—OCOR), +/-decloro (Pat. de los Estados Unidos de América No. 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo) y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

- Los restos de fármaco maitansinoide ejemplares incluyen además aquellos que
- 20 tienen modificaciones tales como: C–9–SH (Pat. de los Estados Unidos de América No. 4.424.219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅); C–14–alcoximetil(demetoxi/CH₂OR) (Pat. de los Estados Unidos de América No. 4.331.598); C–14–hidroximetil o aciloximetil (CH₂OH o CH₂OAc) (Pat. de los Estados Unidos de América No. 4.450.254) (preparado de *Nocardia*);
 - 25 C–15–hidroxi/aciloxi (Pat. de los Estados Unidos de América No. 4.364.866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C–15–metoxi (Pat. de los Estados Unidos de América Nos. 4.313.946 y 4.315.929)

(aislado de *Trewia nudiflora*); C-18-N-demetil (Pat. de los Estados Unidos de América Nos. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-desoxi (Pat. de los Estados Unidos de América No. 4.371.533) (preparado mediante la reducción de tricloruro de titanio /LAH de maitansinol).

De uso particular son DM1 (descrito en la Patente de los Estados Unidos de América No. 5.208.020, incorporada a modo de referencia) y DM4 (descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 7.276.497, incorporada a modo de referencia). Véase además una cantidad de derivados maitansinoides adicionales y métodos en 5.416.064, WO/01/24763, 7.303.749, 7.601.354, USSN 12/631.508, WO02/098883, 6.441.163, 7.368.565, WO02/16368 y WO04/1033272, todos estos documentos quedan expresamente incorporados a modo de referencia en su totalidad.

Los ADCs que contienen maitansinoides, los métodos para su preparación, y su uso terapéutico están descritos, por ejemplo, en las Pat. de los Estados Unidos de América Nos. 5.208.020; 5.416.064; 6.441.163 y en la Patente Europea EP 0 425 235 B1, cuyas descripciones quedan expresamente incorporadas a la presente a modo de referencia. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618–8623 (1996) describieron ADCs que comprenden un maitansinoide designado DM1 ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado es altamente citotóxico hacia células cultivadas de cáncer de colon, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral in vivo.

Chari et al., Cancer Research 52:127–131 (1992) describen ADCs en los cuales un maitansinoide fue conjugado por medio de un ligante disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas de células de cáncer de colon humanas, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén

HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide fue ensayada in vitro en la línea celular de cáncer mamario humano SK-BR-3, la cual expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado farmacológico logró un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, el cual pudo
5 aumentarse aumentando la cantidad de moléculas de maitansinoide por cada molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Para las composiciones que comprenden una pluralidad de anticuerpos, la carga farmacológica es representada por p, la cantidad promedio de moléculas de
10 fármaco por cada Anticuerpo. La carga farmacológica puede oscilar entre 1 a 20 fármacos (D) por Anticuerpo. La cantidad promedio de fármacos por anticuerpo en la preparación de las reacciones de conjugación puede ser caracterizada por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA, y HPLC. La distribución cuantitativa de Conjugados Anticuerpo-fármaco en términos
15 de p también puede ser determinada.

En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de conjugados Anticuerpo-fármaco homogéneos donde p es un cierto valor de Conjugados Anticuerpo-fármaco con otras cargas de fármaco pueden lograrse por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. En realizaciones ejemplares, p
20 es 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 o una fracción de los mismos.

La generación de compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco puede lograrse mediante cualquier técnica conocida por el experto. Brevemente, los compuestos de los conjugados de anticuerpo-fármaco pueden incluir un anticuerpo anti LY75 como la unidad de anticuerpo, un fármaco, y opcionalmente
25 un ligante que une el fármaco y el agente aglutinantes.

Una cantidad de reacciones diferentes están disponibles para la unión covalente de fármacos y/o ligantes a agentes aglutinantes. Esto puede lograrse mediante

- reacción de los residuos de aminoácidos del agente aglutinante, por ejemplo, molécula de anticuerpo, incluyendo los grupos amina de lisina, los grupos de ácido carboxílico libres de ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Un método no
- 5 específico comúnmente empleado de unión covalente es la reacción de carbodiimida para ligar un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a grupos amino (o carboxi) del anticuerpo. Adicionalmente, se han utilizado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para ligar el grupo amino de un compuesto a grupos amino de una molécula de anticuerpo.
- 10 También se encuentra disponible para la unión de los fármacos a los agentes aglutinantes la reacción de base de Schiff. Este método involucra la oxidación de peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo, formando de ese modo un aldehído el cual luego se hace reaccionar con el agente aglutinante. La unión se produce por medio de la formación de una base Schiff con grupos amino
- 15 del agente aglutinante. También pueden utilizarse isotiocianatos como agentes de acoplamiento para unir covalentemente fármacos a los agentes aglutinantes. Otras técnicas son conocidas por el experto en la materia y están dentro del alcance de la presente invención.
- En algunas realizaciones, un intermediario, el cual es el precursor del ligante, se
- 20 hace reaccionar con el fármaco bajo condiciones apropiadas. En otras realizaciones, se utilizan grupos reactivos en el fármaco y/o el intermediario. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermediario, o el fármaco derivado, se hace reaccionar posteriormente con un anticuerpo anti LY75 de la invención bajo condiciones apropiadas.
- 25 Se entenderá que también pueden realizarse modificaciones químicas al compuesto deseado a fin de hacer que las reacciones de ese compuesto sean más convenientes para los propósitos de preparar conjugados de la invención.

Por ejemplo un grupo funcional por ej. amina, hidroxilo, o sulfhidrilo, se puede anexas al fármaco en una porción lo cual tiene un efecto mínimo o aceptable sobre la actividad u otras propiedades del fármaco.

En general, los compuestos de los conjugados anticuerpo-fármaco comprenden una unidad Ligante entre la unidad de fármaco y la unidad de anticuerpo. En algunas realizaciones, el ligante es disociable bajo condiciones intracelulares o extracelulares, de modo que la disociación del ligante libera la unidad de fármaco del anticuerpo en el medioambiente apropiado. Por ejemplo, los tumores sólidos que segregan ciertas proteasas pueden servir como el objetivo del ligante disociable; en otras realizaciones, se utilizan las proteasas intracelulares. En aún otras realizaciones, la unidad ligante no es disociable y el fármaco es liberado, por ejemplo, mediante la degradación de anticuerpos en lisosomas.

En algunas realizaciones, el ligante es disociable mediante un agente de disociación que está presente en el medioambiente intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveolas). El ligante puede ser, por ejemplo, un ligante de peptidilo que es disociado mediante una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, meramente a título enunciativo, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el ligante de peptidilo tiene por lo menos dos aminoácidos de largo o por lo menos tres aminoácidos de largo o más.

Los agentes de disociación pueden incluir, entre otros, catepsinas B y D y plasmina, es sabido que todos ellos hidrolizan derivados de fármaco dipeptídico dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células objetivo (ver, por ej., Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67–123). Los ligantes peptidilo que son disociables mediante enzimas que están presentes en las células que expresan LY75. Por ejemplo, puede emplearse un ligante de peptidilo que es disociable mediante la proteasa dependiente de tiol

catepsina-B, la cual es altamente expresada en tejido cancerígeno (por ej., un ligante Phe-Leu o a Gly-Phe-Leu-Gly (SEC ID NO: 52)). Otros ejemplos de dichos ligantes son descritos, por ej., en la Pat. de los Estados Unidos de América No. 6.214.345, incorporada a la presente a modo de referencia en su totalidad y
5 para todo propósito.

En algunas realizaciones, el ligante peptídico dissociable por una proteasa intracelular es un ligante Val-Cit o un ligante Phe-Lys (véase, por ej., la Pat. de los Estados Unidos de América No. 6.214.345, la cual describe la síntesis de doxorubicina con el ligante val-cit).

10 En otras realizaciones, el ligante dissociable es sensible al pH, es decir, es sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. En general, el ligante sensible al pH es hidrolizable bajo condiciones ácidas. Por ejemplo, puede utilizarse un ligante lábil al ácido que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetato, cetato, o similar). (Véase, por ej., las Pat. de los Estados Unidos de América
15 Nos. 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661.) Dichos ligantes son relativamente estables bajo condiciones de pH neutro, tales como aquellas en la sangre, pero son inestables a por debajo de pH 5.5 o 5.0, el
20 pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el ligante hidrolizable es un ligante tioéter (tal como, por ej., un tioéter unido al agente terapéutico por medio de un enlace acilhidrazona (véase, por ej., la Pat. de los Estados Unidos de América No. 5.622.929).

En aún otras realizaciones, el ligante es dissociable bajo condiciones de reducción
25 (por ejemplo, un ligante de disulfuro). En la técnica se conocen diversos ligantes de disulfuro, incluyendo, por ejemplo, aquellos que pueden ser formados usando SATA (N-succinimidil-5-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-

piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno)- , SPDB y SMPT. (Véase, por ej., Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager
 5 and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase además la Pat. de los Estados Unidos de América No. 4.880.935).

En otras realizaciones, el ligante es un ligante de malonato (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), un ligante de maleimidobenzofilo (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304), o un análogo de 3'-N-amida (Lau et al.,
 10 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12).

En aún otras realizaciones, la unidad ligante no es dissociable y el fármaco es liberado por degradación de anticuerpos. (Véase la Publicación Estadounidense No. 2005/0238649 incorporada a modo de referencia a la presente en su totalidad y para todo propósito).

15 En muchas realizaciones, el ligante es auto-destructivo. En el presente contexto, el término "Espaciador auto-destructivo" se refiere a un resto químico bifuncional que es capaz de unir covalentemente entre sí dos restos químicos espaciados en una molécula tripartita estable. Se separará de manera espontánea del segundo resto químico si su enlace al primer resto es dissociado. Véase por ejemplo, WO
 20 2007/059404A2, WO06/110476A2, WO05/112919A2, WO2010/062171, WO09/017394, WO07/089149, WO 07/018431, WO04/043493 y WO02/083180, dichos documentos se refieren a conjugados de fármaco- sustrato dissociable donde el fármaco y el sustrato dissociable están ligados opcionalmente a través de un ligante auto-destructivo y dichos documentos quedan expresamente
 25 incorporados a modo de referencia.

A menudo el ligante no es sustancialmente sensible al medioambiente extracelular. En el presente contexto, "no sustancialmente sensible al

medioambiente extracelular," en el contexto de un ligante, significa que no más de aproximadamente 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, o no más de aproximadamente 1% de los ligantes, en una muestra de compuesto conjugado anticuerpo-fármaco, se disocian cuando el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco se presenta en un medioambiente extracelular (por ejemplo, en plasma).

Se puede determinar si un ligante no es sustancialmente sensible al medioambiente extracelular, por ejemplo, incubando con plasma el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16, o 24 horas) y luego midiendo la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.

En otras realizaciones no mutuamente exclusivas, el ligante promueve la internalización celular. En ciertas realizaciones, el ligante promueve la internalización celular cuando se conjuga al agente terapéutico (es decir, en el entorno del resto ligante- agente terapéutico del compuesto conjugado anticuerpo-fármaco según lo descrito en este documento). En aún otras realizaciones, el ligante promueve la internalización celular cuando se conjuga a tanto el compuesto auristatina como a los anticuerpos anti LY75 de la invención.

Una variedad de ligantes ejemplares que pueden utilizarse con las presentes composiciones y métodos se describen en WO 2004/010957, La Publicación Estadounidense No. 2006/0074008, la Publicación Estadounidense No. 20050238649, y la Publicación Estadounidense No. 2006/0024317 (cada una de las cuales queda incorporada a modo de referencia a la presente en su totalidad y para todo propósito). Preferentemente, el ligante es SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato).

La carga de fármaco es representada por p y es el número promedio de restos de Fármaco por cada anticuerpo en una molécula. La carga de fármaco ("p") puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más restos

(D) por cada anticuerpo, si bien frecuentemente el número promedio es una fracción o un decimal. En general, la carga de fármaco es de 1 a 4 es frecuentemente útil, y de 1 a 2 es también útil. Los ADCs de la invención incluyen recolecciones de conjugados de anticuerpos con un rango de restos de fármaco, entre 1 y 20, por ejemplo, 1–15, 1–10, 2–9, 3–8, 4–7, 5–6. El número promedio de restos de fármaco por cada anticuerpo en las preparaciones de ADC de las reacciones de conjugación puede ser caracterizado por medios convencionales tales como espectroscopía de masas y ensayo ELISA.

La distribución cuantitativa de ADC en términos de p también puede ser determinada. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de ADN homogéneo donde p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco se puede lograr por medios tales como electroforesis.

Para algunos conjugados anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por la cantidad de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, donde la unión es un tiol de cisteína, como en las realizaciones ejemplares anteriores, un anticuerpo puede tener solamente uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solamente uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales puede adherirse un ligante. En ciertas realizaciones, una carga de fármaco superior, por ej. $p > 5$, puede causar la agregación, insolubilidad, toxicidad, o pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco. En ciertas realizaciones, la carga de fármaco para un ADC de la invención oscila entre 1 y aproximadamente 8; entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6; entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5; entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4; entre aproximadamente 3,1 y aproximadamente 3,9; entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,8; entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,7; entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,6; entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 3,8; o entre aproximadamente 3,3 y

aproximadamente 3,7. De hecho, se ha demostrado que para ciertos ADCs, la relación óptima de restos de fármaco por cada anticuerpo puede ser inferior a 8, y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. Véase US 2005/0238649 A1 (incorporada a la presente a modo de referencia en su totalidad).

En ciertas realizaciones, menos del máximo teórico de restos de fármaco se conjugan a un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el intermediario fármaco- ligante o reactivo ligante, según lo descrito más adelante.

10 En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos los cuales puede estar ligados a un resto de fármaco; de hecho la mayoría de los residuos de tiol de cisteína en los anticuerpos existen como puentes disulfuro. En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede ser reducido con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), bajo

15 condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos reactivos tiol de cisteína. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es sometido a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína.

La carga (relación fármaco/ anticuerpo) de un ADC puede ser controlada de diferentes maneras, por ej.: (i) limitando el exceso molar del intermediario de fármaco- ligante o reactivo ligante con relación al anticuerpo, (ii) limitando el tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación, (iii) limitando parcial o (sic) las condiciones reductoras para la modificación del tiol de cisteína, (iv) modificado por técnicas recombinantes la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de modo

20 que la cantidad y posición de los residuos de cisteína se modifique para el control de la cantidad y/o posición de las adhesiones de ligante- fármaco (tales como tioMab o tioFab preparados según lo descrito en esta invención y en

WO2006/034488 (incorporada a la presente a modo de referencia en su totalidad)).

Se entenderá que donde más de un grupo nucleófilo reacciona con un intermediario fármaco- ligante o reactivo ligante seguido por reactivo de resto de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por cada anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla mediante un ensayo de anticuerpos ELISA dual, el cual es específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Las moléculas de ADC individuales pueden ser identificadas en la mezcla mediante espectroscopia de masas y separadas por HPLC, por ej. cromatografía de interacción hidrófoba.

En algunas realizaciones, un ADC homogéneo con un valor de carga único puede ser aislado de la mezcla de conjugación por electroforesis o cromatografía.

Métodos para determinar el efecto citotóxico de ADCs

- Los métodos para determinar si un fármaco o conjugado Anticuerpo-fármaco ejercen un efecto citostático y/o citotóxico sobre una célula son conocidos. En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado anticuerpo- fármaco puede medirse: exponiendo las células de mamífero que expresan una proteína objetivo del conjugado Anticuerpo – Fármaco en un medio de cultivo celular; cultivando las células durante un período entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 5 días; y midiendo la viabilidad celular. Pueden utilizarse ensayos in vitro basados en células para medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad, e inducción de apoptosis (activación de caspasa) del conjugado anticuerpo- fármaco.
- Para determinar si un conjugado Anticuerpo – Fármaco ejerce un efecto citostático, se puede emplear un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, células cancerígenas que expresan un antígeno objetivo en una

densidad de 5.000 células/ pocillo de una placa de 96 pocillos se pueden cultivar durante un período de 72 horas y se pueden exponer a 0.5 μ Ci de ^3H -timidina durante las 8 horas finales del período de 72 horas. La incorporación de ^3H -timidina en las células del cultivo se mide en presencia y ausencia del conjugado

5 Anticuerpo - Fármaco.

Para determinar la citotoxicidad, se puede medir la necrosis o la apoptosis (muerte celular programada). La necrosis está generalmente acompañada por un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática; dilatación de la célula, y ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis es generalmente
10 caracterizada por la vacuolización (“blebbing”) de la membrana, condensación del citoplasma, y la activación de endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de estos efectos en las células cancerígenas indica que un conjugado Anticuerpo – Fármaco es útil en el tratamiento de cánceres.

Se puede medir la viabilidad celular determinando en una célula la absorción de
15 un colorante tal como rojo neutro, azul tripán, o azul ALAMAR™ (véase, por ej., Page *et al.*, 1993, Intl. J. Oncology 3:473–476). En ese tipo de ensayo, las células se incuban en medio que contiene el colorante, las células se lavan, y el colorante remanente, que refleja la absorción celular del colorante, se mide espectrofotométricamente. El colorante de unión a una proteína sulforodamina B
20 (SRB) también puede utilizarse para medir la citotoxicidad (Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:1107–12).

Alternativamente, una sal de tetrazolio, tal como MTT, se utiliza en un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia y proliferación de células de mamífero detectando células vivas, pero no muertas (véase, por ej., Mosmann,
25 1983, J. Immunol. Methods 65:55–63).

La apoptosis puede ser cuantificada midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. Los métodos fotométricos comerciales para la determinación in vitro

cuantitativa de la fragmentación del ADN se encuentran disponibles. Los ejemplos de dichos ensayos, incluyendo TUNEL (el cual detecta la incorporación de nucleótidos etiquetados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, son descritos en Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34–37 (Roche Molecular Biochemicals).

- 5 La apoptosis también puede ser determinada midiendo los cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, como con la necrosis, la pérdida de integridad de la membrana plasmática puede ser determinada midiendo la absorción de ciertos colorantes (por ej., un colorante fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un método para medir la cantidad de células
10 apoptóticas ha sido descrito por Duke y Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1–3.17.16). Las células también pueden ser etiquetadas con un colorante de ADN (por ej., naranja de acridina, bromuro de etidio, o yoduro de propidio) y las células observadas para la condensación de cromatina y marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros
15 cambios morfológicos que pueden ser medidos para determinar la apoptosis incluyen, por ej., la condensación citoplásmica, aumento de la vacuolización de membrana, y encogimiento celular.

- La presencia de células apoptóticas puede medirse tanto en los compartimientos anexados como en los “flotantes” de los cultivos. Por ejemplo, ambos
20 compartimientos pueden ser recolectados eliminando el sobrenadante, tripsinizando las células adheridas, combinando las preparaciones luego de un paso de lavado por centrifugación (por ej., 10 minutos a 2000 rpm), y detectando la apoptosis (por ej., midiendo la fragmentación del ADN). (Véase, por ej., Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:3110–16).

- 25 *In vivo*, el efecto de una composición terapéutica del anticuerpo anti LY75 de la invención se puede evaluar en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, se pueden utilizar modelos xenogénicos de cáncer, donde los explantos de cáncer o

tejidos de xenoinjerto explantados se introducen en animales inmunocomprometidos, tales como ratones desnudos o SCID (Klein *et al.*, 1997, Nature Medicine 3: 402–408). Se puede medir la eficacia usando ensayos que miden la inhibición de la formación tumoral, regresión o metástasis tumoral, y
 5 similares.

Las composiciones terapéuticas empleadas en la práctica de los métodos antes mencionados pueden ser formuladas en composiciones farmacéuticas que comprenden un portador adecuado para el método de administración deseada. Los portadores adecuados incluyen cualquier material que cuando se combina
 10 con la composición terapéutica retiene la función antitumoral de la composición terapéutica y es generalmente no reactiva con el sistema inmune del paciente. Los ejemplos incluyen, meramente a título enunciativo, cualquiera de una cantidad de portadores farmacéuticos convencionales tales como soluciones salinas reguladas con fosfato estériles, agua bacteriostática, y similares (véase,
 15 en general, *Remington's Pharmaceutical Sciences* Edición no. 16, A. Osal., Ed., 1980).

Métodos para producir anticuerpos

Los anticuerpos divulgados en la presente se pueden preparar con cualquier
 20 método adecuado. Estos métodos incluyen el cultivo de una célula huésped que contiene ácido(s) nucleico(s) aislado(s) que codifica(n) los anticuerpos. Como los expertos en la técnica podrán apreciar, esto puede realizarse de diversas maneras, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo. En el caso en que los anticuerpos son anticuerpos tradicionales de longitud completa, por ejemplo, una
 25 región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera bajo condiciones tales que un anticuerpo es producido y puede aislarse.

Las cadenas pesada y ligera variables de LY75_A1 son descritas en esta

invención (tanto secuencias proteicas como de ácidos nucleicos); como será apreciado en la técnica, esto puede aumentarse fácilmente para producir cadenas pesadas y ligeras de longitud completa. Es decir, habiendo proporcionado los fragmentos de ADN que codifican segmentos de V_H y V_K según lo expuesto en la

5 presente invención, estos fragmentos de ADN pueden ser adicionalmente manipulados por técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadenas de anticuerpos de longitud completa, en genes de fragmentos Fab, o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_K o V_H está ligado

10 operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un ligante flexible. El término “ligado operativamente”, según se emplea en este contexto, tiene el propósito de significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN

15 permanecen en marco.

El ADN aislado que codifica la región de V_H puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa ligando operativamente el ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (C_H1 , C_H2 y C_H3). Las secuencias de genes de regiones constantes de cadena

20 pesada murinos son conocidas en la técnica [ver por ej. Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, US Department of Health and Human Services, Publicación NIH No. 91-3242] y se pueden obtener fragmentos de ADN que abarcan a estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región

25 constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferentemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede estar ligado

operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante C_H1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región de V_L / V_K puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como también un gen de cadena ligera de Fab) ligando operativamente el ADN que codifica V_L con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, C_L . Las secuencias de genes de regiones constantes de cadena ligera ya son conocidas en la técnica [ver, por ej. Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, US Department of Health and Human Services, Publicación NIH No. 91-3242] y se pueden obtener fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. En realizaciones preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifica V_H y V_L / V_K están ligados operativamente a otro fragmento que codifica un ligante flexible, por ej. que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4 - Ser)_3$, de modo que las secuencias V_H y V_L / V_K pueden ser expresadas como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones V_L / V_K y V_H unidas mediante el ligante flexible [ver por ej. Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554].

Se proporcionan ácidos nucleicos los cuales codifican los anticuerpos divulgados en la presente. Dichos polinucleótidos codifican para las regiones variables y constantes de cada una de las cadenas pesada y ligera, si bien otras combinaciones son también contempladas de conformidad con las composiciones descritas en esta invención.

Los polinucleótidos pueden estar en la forma de ARN o ADN. Los polinucleótidos

en la forma de ADN, ADNc, ADN genómico, análogos de ácidos nucleicos, y ADN sintéticos también son utilizables. El ADN puede ser de doble hebra o de hebra simple, y si es de hebra simple, puede ser la hebra codificante (sentido) o la hebra no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica el polipéptido
5 puede ser idéntica a la secuencia codificante proporcionada en esta invención o puede ser una secuencia codificante diferente, secuencia que, como resultado de la redundancia o la degeneración del código genético, codifica los mismos polipéptidos que el ADN proporcionado en esta invención.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos
10 divulgados en la presente son incorporados en vectores de expresión, los cuales pueden ser extracromosómicos o diseñados para integrarse en el genoma de la célula huésped en la cual es introducido. Los vectores de expresión pueden contener cualquier cantidad de secuencias reguladoras apropiadas (incluyendo, meramente a título enunciativo, secuencias controles transcripcionales o de
15 traducción, promotores, sitios de unión ribosómica, mejoradores, orígenes de replicación, etc.) u otros componentes (genes de selección, etc.), todas éstas están ligadas operativamente como es bien sabido en la técnica. En algunos casos se utilizan dos ácidos nucleicos y cada uno se coloca en un vector de expresión diferente (por ej. la cadena pesada en un primer vector de expresión, la
20 cadena ligera en un segundo vector de expresión), o alternativamente se pueden colocar en el mismo vector de expresión. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del o de los vectores de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc.

25 En general, los ácidos nucleicos y/o la expresión pueden introducirse en una célula huésped adecuada para crear una célula huésped recombinante usando cualquier método apropiado para la célula huésped seleccionada (por ej.,

transformación, transfección, electroporación, infección), de modo que la o las moléculas de ácido nucleico estén ligadas operativamente a uno o más elementos de control de la expresión (por ej., en un vector, en una construcción creada mediante procesos en la célula, integrada en el genoma de la célula huésped). La

5 célula huésped recombinante resultante puede mantenerse bajo condiciones adecuadas para la expresión (por ej. en presencia de un inductor, en un animal no humano adecuado, en medio de cultivo adecuado suplementado con sales apropiadas, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc.), por lo cual se producen el o los polipéptidos codificados. En algunos casos, las

10 cadenas pesadas son producidas en una célula y la cadena ligera en otra.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Recolección Americana de Cultivos Tipificados (ATCC), Manassas, VA incluyendo meramente a título enunciativo las células de ovario de

15 hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), células HEK 293, células NSO, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK, por sus siglas en inglés), células renales de mono (COS, por sus siglas en inglés), células de carcinoma hepatocelular humano (por ej., Hep G2), y una cantidad de otras líneas celulares.

Las células no mamíferas incluyendo meramente a título enunciativo las células

20 de bacterias, levaduras, insectos y plantas también pueden utilizarse para expresar anticuerpos recombinantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden ser producidos en animales transgénicos tales como vacas o gallinas.

Los métodos generales para la biología molecular, expresión, purificación y screening de anticuerpos son bien conocidos, por ejemplo, véase las Patentes de

25 los Estados Unidos de América Nos. 4.816.567, 4.816.397, 6.331.415 y 7.923.221, así como también Antibody Engineering, editado por Kontermann & Dubel, Springer, Heidelberg, 2001 y 2010 Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin

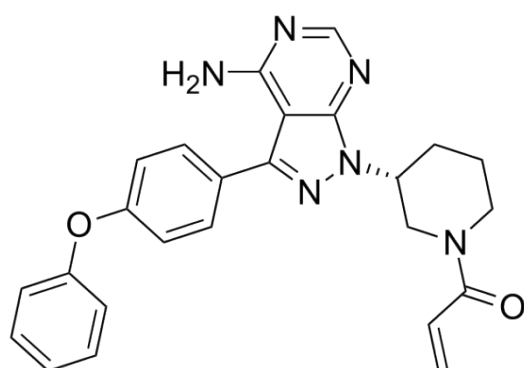
Chem Biol 5:683–689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339–76; y Morrison, S. (1985) Science 229:1202.

En una realización adicional de la invención, el componente (B) de la combinación farmacéutica es ibrutinib, o una sal de este farmacéuticamente aceptable. Ibrutinib (Imbruvica® es un fármaco de molécula pequeña que se une permanentemente a

5 tirosina quinasa de Bruton (BTK). Este se ha usado previamente para tratar cánceres de células B tales como linfoma de células del manto, leucemia linfocítica crónica y macroglobulinemia de Waldenström (una forma de linfoma no Hodgkin). A continuación se brindan la fórmula estructural y química de ibrutinib:

10

15



(R)-1-(3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona.

Ibrutinib se vende con el nombre comercial Imbruvica®. Está disponible de Pharmacyclics, Inc. (EE.UU.).

Composiciones Farmacéuticas

20 La combinación farmacéutica de la invención está en la forma de una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial. De modo similar, en los métodos de la invención, los componentes (A) y (B) de la combinación farmacéutica se pueden administrar a un paciente de forma simultánea, separada o secuencial.

25 La expresión “preparación combinada” incluye combinaciones fijas y combinaciones no fijas.

La expresión “combinación fija” significa que los ingredientes activos (por ejemplo,

los componentes (A) y (B)) están en la forma de una sola entidad o dosis. En otras palabras, los ingredientes activos están presentes en una única composición o formulación.

La expresión “combinación no fija” significa que los ingredientes activos (por ejemplo, los componentes (A) y (B)) están presentes en diferentes entidades o dosis (por ejemplo, como composiciones o formulaciones separadas), por ejemplo, como un kit de partes. Los componentes independientes (A) y (B) (en sus composiciones o formulaciones deseadas) luego se pueden administrar separadamente o secuencialmente, en el mismo intervalo de tiempo o en diferentes intervalos de tiempo.

Cuando la administración es secuencial, la demora en administrar el segundo componente no deberá ser tal que se pierda el beneficio del efecto que surge del uso de la combinación. Por lo tanto, en una realización, tratamiento secuencial supone la administración de cada componente de la combinación dentro de un período de 11 días. En otra realización, este período es de 10 días. En otra realización, este período es de 9 días. En otra realización, este período es de 8 días. En otra realización, este período es de 7 días. En otra realización, este período es dentro de 6 días. En otra realización, este período es dentro de 5 días. En otra realización, este período es dentro de 4 días. En otra realización, este período es dentro de 3 días. En otra realización, este período es dentro de 2 días. En otra realización, este período es dentro de 24 horas. En otra realización este período es dentro de 12 horas.

Los componentes (A) y (B) se pueden administrar en cualquier orden, por ejemplo, el componente (A) primero y luego el componente (B); o el componente (B) primero y luego el componente (A).

La proporción entre las cantidades totales del componente (A) y del componente (B) a ser administrada en la preparación combinada puede variar, por ejemplo, a

fin de satisfacer las necesidades de una sub-población de pacientes que se ha de tratar o las necesidades de un solo paciente con necesidades diferentes que se pueden deber a la edad, el sexo, el peso corporal, etc. de los pacientes.

Los componentes (A) y (B), ya sea presentes en una única composición o en
5 composiciones separadas, se pueden formular independientemente con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las combinaciones farmacéuticas de la invención también pueden incluir por lo menos un otro agente antitumoral, o con un agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden utilizar en terapia de combinación son descritos en
10 forma más detallada más adelante en la sección sobre usos de los anticuerpos divulgados en la presente.

En el presente contexto, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera o todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y
15 similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ej. por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, es decir el anticuerpo, inmunoconjugado, o molécula biespecífica, puede estar recubierto en un material
20 para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar al compuesto.

Los componentes (A) y/o (B) pueden estar en la forma de una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto parental y no
25 imparte ningún efecto toxicológico no deseado [ver, por ej. Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1–19]. Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos

incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como también de ácidos orgánicos no tóxicos tales como los ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, los ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxí alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y sulfónicos aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como también de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Una combinación farmacéutica de la invención o parte de esta también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden ser empleados en las combinaciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y las mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido

en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de surfactantes.

- Estas combinaciones o partes de estas también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede
- 5 ser asegurada tanto mediante procedimientos de esterilización, más arriba, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Adicionalmente, puede lograrse una absorción
- 10 prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes los cuales retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables o dispersiones estériles. El uso de dichos medios y
- 15 agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, su utilización en las composiciones farmacéuticas de la invención se contempla. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.
- 20 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para la elevada concentración de fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol,
- 25 poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y las mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo

el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables
5 puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados con anterioridad, según lo requerido,
10 seguido por microfiltración con esterilización. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son
15 secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma única de dosificación variará dependiendo del sujeto que
20 se está tratando, y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma única de dosificación generalmente será aquella cantidad de la composición la cual produce un efecto terapéutico. En general, del 100 por ciento, esta cantidad oscilará entre aproximadamente 0,01 por ciento y aproximadamente
25 99 por ciento de ingrediente activo, preferentemente entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 70 por ciento, más preferentemente entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente 30 por ciento del ingrediente

activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación son ajustados para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ej., una combinación sinérgica, una respuesta terapéutica).

Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, pueden administrarse diversas

5 dosis divididas con el transcurso del tiempo o la dosis puede ser reducida o incrementada proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación en el presente
10 contexto se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que serán tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo que se calcula que producirá el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención se
15 dictan por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se quiere lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de formación de ese tipo de compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Para la administración del anticuerpo anti LY75 o anti CD20, la dosificación oscila
20 entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, por ejemplo, 0,001 a 50mg/kg, 0,005 a 20mg/kg, 0,01 a 10mg/kg y más generalmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser 0,05 mg/kg de peso corporal, 0,1 mg/kg de peso corporal, 0,3 mg/kg de peso corporal, 0,3 mg/kg de peso corporal, 0,5 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 2 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 4 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de
25 peso corporal, 6 mg/kg de peso corporal, 7 mg/kg de peso corporal, 8 mg/kg de peso corporal, 9 mg/kg de peso corporal, 10 mg/kg de peso corporal, 12 mg/kg de

peso corporal, 15 mg/kg de peso corporal, 20 mg/kg de peso corporal, 25 mg/kg de peso corporal, 30 mg/kg de peso corporal, o dentro del rango de 0,1–20 mg/kg, 0,5–15 mg/kg, 1–10 mg/kg, 2–8 mg/kg, 3–7 mg/kg, 4–6 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar abarca la administración una vez al día, una vez cada 2 días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 6 semanas, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti LY75 de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por medio de la administración intravenosa, siendo el anticuerpo administrado usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunas realizaciones, la dosis del anticuerpo anti LY75 (por ejemplo, LY75-DM4) se ajusta para obtener una concentración de anticuerpo en plasma de 0,01 a 1,5 nM o 0,018 a 1,2 nM (por ejemplo, aproximadamente 0,018, 0,037, 0,075, 0,15, 0,3, 0,6 o 1,2 nM). Preferentemente, el anticuerpo anti LY75 se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 0,03 nM a 0,30 nM.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti CD20 se formula en una solución de 10mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti CD20 se administra de forma i.v. con una dosis de 350-400mg/m², preferentemente una vez por semana.

En algunas realizaciones, la dosis del anticuerpo anti CD20 (por ejemplo, Rituximab) se ajusta para obtener una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 2,34 a 150 nM (por ejemplo, aproximadamente 2,34, 4,68, 9,37, 18,75, 37,5, 75 o 150 nM). El anticuerpo anti CD20 (por ejemplo, Rituximab) se puede administrar con una dosis de aproximadamente 1400 mg/23.400 unidades de forma subcutánea. En algunas realizaciones, la dosis es 200 mg, 400 mg, 600

mg, 800 mg, 1000 mg o 1200 mg. El anticuerpo anti CD20 (por ejemplo, Rituximab) se puede administrar con uno o más de los siguientes: ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, oncovin y prednisona o prednisolona (es decir tratamiento CHOP).

- 5 En algunas realizaciones, la dosis de Ibrutinib se ajusta para lograr una concentración en plasma de aproximadamente 15,6 a 1000 nM (por ejemplo, aproximadamente 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250, 500 o 1000 nM). En otras realizaciones, la dosis de Ibrutinib se ajusta para lograr una concentración en plasma de aproximadamente 1,56 a 100 nM (por ejemplo, aproximadamente 1,5,
- 10 3,1, 6,2, 12,5, 25, 50 o 100 nM). La dosis de Ibrutinib puede ser aproximadamente 560 mg (por ejemplo, 4 cápsulas de 140 mg). Esta se puede administrar en forma oral. En algunas realizaciones, la dosis de Ibrutinib es aproximadamente 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg o 500 mg.

- Preferentemente, la combinación de los componentes (A) y (B) es una
- 15 combinación sinérgica. El experto en la técnica comprenderá que una combinación sinérgica es una donde el efecto de la combinación es mayor que la suma de los efectos de los componentes individuales. La sinergia se puede cuantificar usando el índice de combinación (CI) de Chou-Talalay (ver *"Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses"*, Zhao L, et al. *Clin Cancer Res.* (2004) 1° de diciembre; 10(23):7994-8004; y *"Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design"*, Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ., *J. Natl. Cancer Inst.* (1994) 19 de octubre;
 - 20 86(20):1517-24). Este método del índice de combinación (CI) está basado en la ecuación del efecto de fármacos múltiples derivada del principio del efecto mediano de la ley de acción de masas. Este proporciona una definición
 - 25

cuantitativa de sinergia fuerte ($CI < 0,3$), sinergia ($CI = 0,3-0,9$), efecto aditivo ($CI = 0,9-1,1$) o antagonismo/sin beneficios ($CI > 1,1$), y proporciona el algoritmo para el programa de computación para la simulación automática para combinaciones de fármacos. Este toma en cuenta la potencia (el valor $D(m)$) y la forma de la

5 curva dosis-efecto (el valor m) de cada fármaco solo y sus combinaciones. El índice de combinación (CI) de Chou-Talalay se puede estimar usando el paquete Synergy R (ver *“Preclinical versus Clinical Drugs Combination Studies”*, Chou TC. *Leuk. Lymphoma*. (2008);49(11):2059-2080, y las referencias allí citadas, que se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad). El CI de la

10 combinación se puede ensayar en una línea celular adecuada, por ejemplo, en líneas celulares ABC-DLBCL (tal como TMD8 o HBL1), por ejemplo, en las condiciones usadas en el Ejemplo 26.

Preferentemente, la combinación farmacéutica de la invención es una combinación sinérgica donde el índice de combinación (CI) Chou-Talalay es

15 menor que 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3 o 0,2. Preferentemente, el CI es 0,1-0,5, 0,1-0,3 o 0,1-0,2.

En particular, se proporciona un método para tratar cáncer en un paciente que comprende administrar de forma simultánea, secuencial o separada a un paciente que las necesita cantidades sinérgicas terapéuticamente eficaces de los

20 componentes (A) y (B) de una combinación farmacéutica de la invención. También se proporciona una combinación farmacéutica de la invención para usar en el tratamiento de cáncer, donde se administran al paciente cantidades sinérgicas de los componentes (A) y (B) en forma simultánea, separada o secuencial para el tratamiento del cáncer. Preferentemente, se administran al

25 paciente cantidades de los componentes (A) y (B) a fin de proporcionar las concentraciones en plasma divulgadas anteriormente.

También se proporciona el uso de cantidades sinérgicas de los componentes (A)

y (B) de la combinación farmacéutica de la invención en la elaboración de una combinación farmacéutica para uso simultáneo, separado o secuencia para el tratamiento de cáncer. También se proporciona una combinación farmacéutica sinérgica de la invención para usar en tratamientos o para usar como un medicamento.

En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran en forma simultánea, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los rangos indicados. El anticuerpo es generalmente administrado en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones únicas pueden ser, por ejemplo, diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, mensualmente, cada tres meses, cada seis meses, o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares según lo indicado midiendo los niveles en sangre de anticuerpo contra el antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1–1000 µg /ml, 5–750 µg /ml, 10–600 µg /ml, 15–500 µg /ml, 20–400 µg /ml y en algunos métodos aproximadamente 25–300 µg /ml.

Alternativamente, los anticuerpos anti LY75 y/o anti CD20 pueden ser administrados como formulaciones de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguido por los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja en intervalos relativamente infrecuentes durante un período largo de tiempo. Algunos pacientes

continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina el progreso de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A continuación, el paciente puede ser administrado un régimen profiláctico.

Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos en las combinaciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar de modo de obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones en particular de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto en particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales empleados en combinación con las composiciones en particular empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una “dosificación terapéuticamente eficaz” de un anticuerpo anti LY75 o un anticuerpo anti CD20 preferentemente da como resultado una disminución de la severidad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de los tumores mediados por LY75 o CD20, una “dosificación terapéuticamente eficaz” preferentemente inhibe el crecimiento celular o el

crecimiento tumoral en por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, más preferentemente en por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50% incluso más preferentemente en por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70% y aún más preferentemente en por lo menos aproximadamente 80% o por lo menos aproximadamente 90%, con relación a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto de inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede ser evaluada examinando la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento celular, dicha inhibición puede medirse *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o de otro modo aliviar los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica podría determinar dichas cantidades en base a factores tales como el tamaño del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto, y la composición en particular o ruta de administración seleccionada.

Una combinación farmacéutica de la presente invención puede ser administrada por medio de una o más rutas de administración usando uno o más de diversos métodos conocidos en la técnica. Los componentes (A) y (B) se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes. Como el experto en la técnica apreciará, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas preferidas de administración para los anticuerpos de la invención incluyen las rutas intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. La frase “administración parenteral” en el presente contexto significa modos de administración que no sean la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluye, entre otros,

la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

- 5 Alternativamente, el anticuerpo anti LY75 o anti CD20 pueden ser administrados por medio de una ruta de administración no parental, tal como una ruta tópica, epidérmica, de la mucosa, por ejemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o tópicamente.

Los compuestos activos pueden ser preparados con portadores que protegerán al
 10 compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas microencapsulados de administración. Pueden utilizarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos
 15 para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica [ver, por ej. *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (1978) J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y].

Las composiciones terapéuticas pueden ser administradas con dispositivos
 20 médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, el componente (A) y/o el componente (B) pueden ser administrados con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de
 25 implantes bien conocidos y módulos útiles en la presente invención incluyen: la Patente de los Estados Unidos de América No. 4.487.603, la cual describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad

- controlada; Patente de los Estados Unidos de América No. 4.486.194, la cual describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente de los Estados Unidos de América No. 4.447.233, la cual describe una bomba de infusión de medicamento para administrar medicamento a una
- 5 velocidad de infusión precisa; Patente de los Estados Unidos de América No. 4.447.224, la cual describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; Patente de los Estados Unidos de América No. 4.439.196, la cual describe un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimientos de múltiples cámaras; y la Patente de los
- 10 Estados Unidos de América No. 4.475.196, la cual describe un sistema de administración de fármaco osmótico. Estas patentes quedan incorporadas a la presente a modo de referencia. Muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos de ese tipo son conocidos por los expertos en la técnica.
- 15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti LY75 y/o anti CD20 pueden ser formulados para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos crucen la BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos
- 20 de manufactura de liposomas, véase, por ej. las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos los cuales son selectivamente transportados en células u órganos específicos, aumentando de ese modo la administración del fármaco dirigida [véase, por ej. V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685].
- 25 Los ejemplos de restos de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ej. la Patente de los Estados Unidos de América N° 5.416.016.); manósidos [Umezawa *et al.* (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038]; anticuerpos

[P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180]; receptor de la Proteína A surfactante [Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134]; p120 [Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090]; véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos y Métodos

En el presente contexto, el término "sujeto" tiene el propósito de incluir animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen a todos los vertebrados, por ej. a los mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios, y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen a los pacientes humanos que tienen trastornos mediados por la actividad de LY75 y/o la actividad de CD20.

Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con la expresión aberrante de LY75 y/o CD20. Dada la expresión de LY75 sobre células tumorales, las combinaciones y los métodos de la presente invención se pueden usar para tratar a un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan LY75 o en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de dicho trastorno, inclusive, por ejemplo, leucemia, inclusive leucemia linfocítica crónica y leucemia mieloide aguda, linfoma no Hodgkin, inclusive DLBCL, linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), linfoma de células B, rico en células T/histiocitos, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmacítico, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de zona marginal, linfoma de células T, linfoma de células T periféricas, linfoma anaplásico de células grandes y linfoma angioinmunoblástico de células T. Se ha demostrado que LY75 se internaliza en

la unión al anticuerpo como se ilustra en los Ejemplos 5 y 7 a continuación, permitiendo así usar los anticuerpos LY75 en cualquier mecanismo de acción de carga útil, por ejemplo, en una estrategia ADC (conjugados anticuerpo fármaco, por sus siglas en inglés), radioinmunoconjugados, o una estrategia ADEPT (tratamiento enzimático con profármaco dirigido por anticuerpos, por sus siglas en inglés).

Los anticuerpos anti LY75, generalmente administrados como ADCs, pueden utilizarse para inhibir o bloquear la función de LY75 lo cual, a su vez, puede ser vinculado a la prevención o mejora de ciertos síntomas de enfermedad, implicando de ese modo el LY75 como un mediador de la enfermedad. Esto puede lograrse contactando una muestra y una muestra control con el anticuerpo anti LY75 bajo condiciones que da lugar a la formación de un complejo entre el anticuerpo y LY75. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y el LY75 se detecta y se compara en la muestra y el control.

Las rutas adecuadas para administrar las composiciones de los anticuerpos (por ej. anticuerpos monoclonales e inmunoconjugados) *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden ser administradas por inyección (por ej. intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y del peso del sujeto y de la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpos.

Según lo descrito previamente, los anticuerpos anti LY75 y/o anti CD20 pueden ser administrados en conjunto con uno y otros agentes terapéuticos, por ej. con un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede estar ligado al agente (como un inmunocomplejo) o puede ser administrado por separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede ser administrado antes, después o

concurrentemente con el agente o puede ser administrado en conjunto con otras terapias conocidas, por ej. una terapia anticancerígena, por ej. radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino sulfato de bleomicina, carmustina, 5 clorambucilo, y ciclofosfamida hidroxiurea los cuales, por sí mismos, son solamente eficaces en niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino es administrado por vía intravenosa como una dosis de 100 mg/kg una vez cada cuatro semanas y la adriamicina es administrada por vía intravenosa como una dosis de 60–75 mg/ml una vez cada 21 días. Otros agentes adecuados 10 para la administración conjunta con los anticuerpos de la invención incluyen otros agentes empleados para el tratamiento de cánceres, por ej. cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer mamario, cáncer ovárico o cáncer pulmonar, tales como Avastin®, 5FU y gemcitabina. La administración conjunta de los anticuerpos anti LY75 o sus fragmentos de unión al antígeno, de la presente 15 invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerígenos los cuales funcionan por medio de mecanismos diferentes los cuales proporcionan un efecto citotóxico para las células tumorales humanas. Dicha administración conjunta puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o debidos a un cambio en la antigenicidad de las células 20 tumorales que las tornaría no reactivas con el anticuerpo.

Las combinaciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar conjuntamente con suero y/o complemento. Estas composiciones pueden ser ventajosas cuando el complemento está situado en proximidad cercana a los anticuerpos. Alternativamente, los anticuerpos y el complemento o suero pueden 25 ser administrados por separado.

Dentro del alcance de la presente invención también hay kits que comprenden los componentes (A) y (B) junto con instrucciones de uso. El kit puede contener

además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales (por ej. un anticuerpo que tiene una actividad complementaria que se une a un epítopo en el antígeno LY75 distinto del primer anticuerpo).

- 5 Por consiguiente, los pacientes tratados con combinaciones farmacéuticas de la invención pueden ser administrados adicionalmente (con anterioridad a, simultáneamente con, o luego de la administración de un anticuerpo divulgado en la presente) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, el cual mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos.
- 10 En otras realizaciones, el sujeto puede ser tratado adicionalmente con un agente que modula, por ej. mejora o inhibe, la expresión o actividad de Fcγ o de los receptores de Fcγ, por ejemplo, tratando al sujeto con una citoquina. Las citoquinas preferidas para la administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF,
- 15 por sus siglas en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), interferón-γ (IFN-γ), y factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés).

Todas las referencias citadas en esta memoria descriptiva, incluyendo meramente a título enunciativo todos los documentos, publicaciones, patentes, solicitudes de

20 patentes, presentaciones, textos, informes, manuscritos, folletos, libros, publicaciones en internet, artículos de boletines, periódicos, fichas de producto, y similares, se incorporan a modo de referencia en esta memoria descriptiva en sus totalidades. La descripción de las referencias en esta invención tiene meramente el propósito de sintetizar las aseveraciones realizadas por sus autores y no se

25 admite de ninguna manera que ninguna referencia constituya técnica previa y los Solicitantes se reservan el derecho de probar la precisión y pertinencia de las referencias citadas.

Si bien la invención que antecede ha sido descrita con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de aclarar su comprensión, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones dependientes.

La presente invención es adicionalmente ilustrada mediante los siguientes ejemplos los cuales no deberían ser interpretados como una limitación adicional.

Ejemplo 1: Generación de Anticuerpos Monoclonales Humanos Contra el

10 Antígeno LY75

Siguiendo procedimientos convencionales, se inmunizaron ratones (IgG1 de xenoratonos) con células CHO transfectadas con LY75 de longitud completa.

La especificidad de anticuerpos cultivados contra el LY75 fue ensayada mediante citometría de flujo en células HEK293 transfectadas con LY75 y posteriormente en
15 células HT29 que expresan LY75. Para analizar la capacidad de los anticuerpos para unirse a la proteína LY75 de superficie celular, los anticuerpos fueron incubados con las células que expresan LY75. Las células se lavaron en buffer FACS (DPBS, 2% FBS), se centrifugaron y se resuspendieron en 100µl del anticuerpo contra LY75 primario diluido (también diluido en buffer FACS). El
20 complejo de línea celular- anticuerpo se incubó sobre hielo durante 60 min y luego se lavó dos veces con buffer FACS según lo descrito con anterioridad. El pellet de célula- anticuerpo se resuspendió en 100µl del anticuerpo secundario diluido (también diluido en buffer FACS) y se incubó sobre hielo durante 60 min sobre hielo. El pellet se lavó como se describió anteriormente y se resuspendió en 200µl
25 de buffer FACS. Las muestras se cargaron en el citómetro de flujo BD FACScanto II y los datos se analizaron usando el programa informático BD FACSdiva (resultados no mostrados).

Ejemplo 2: Caracterización Estructural de Anticuerpos Monoclonales contra LY75

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal LY75_A1 fueron obtenidas usando técnicas de
5 PCR estándares y fueron secuenciadas usando técnicas convencionales de secuenciamiento de ADN.

Las secuencias de anticuerpos pueden ser mutagenizadas para revertir nuevamente a residuos de línea germinal en uno o más residuos.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena
10 pesada de LY75_A1 se muestran en SEC ID NO: 3 y 1, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de LY75_A1 se muestran en SEC ID NO: 4 y 2, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada LY75_A1 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal
15 humana conocidas demostraron que la cadena pesada de LY75_A1 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3–15 y un segmento J_H de la línea germinal humana J_H JH4. El análisis adicional de la secuencia de V_H de LY75_A1 usando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se
20 muestran en SEC ID NOs: 5, 6 y 7, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias de V_H de CDR1, CDR2 y CDR3 de LY75_A1 a la secuencia de línea germinal V_H 3–15 y de línea germinal J_H JH4 se muestran en la Figura 1.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de LY75_A1 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea
25 germinal humana conocidas demostraron que la cadena ligera de LY75_A1 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K O12 y un segmento J_K de la línea germinal humana J_K JK4. El análisis posterior de la secuencia de V_K de LY75_A1

que utiliza el sistema de Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera según lo mostrado en SEC ID NOs:8, 9 y 10, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias de V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de LY75_A1 a las secuencias de
 5 línea germinal V_K O12 y de línea germinal J_K JK4 se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 3: Inmunohistoquímica Usando Anticuerpo Monoclonal contra LY75

Usando los anticuerpos monoclonales humanos específicos para LY75, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en pellets de células FFPE HT-29 y A549, grupos de
 10 linfoma no Hodgkin y cáncer pancreático de FFPE, y tumores de linfoma/leucemia congelados frescos, secciones de cáncer ovárico, cáncer pancreático, y cáncer mamario y grupos de tejidos normales.

Materiales y métodos

Materiales

- 15 Xilenos (X5P-1gal) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América.
 Histoprep 100% etanol (HC-800-1GAL) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América.
 10x buffer de citrato para recuperación de epítomos inducida por calor (AP9003125) de Thermo Scientific, MA, Estados Unidos de América.
 20 Thermo Scientific* Pierce* Peroxidase Suppressor (35000) de Thermo Scientific, MA, Estados Unidos de América.
 Bloque de proteína libre de suero (X0909) de Dako, CA, Estados Unidos de América
 Anticuerpo secundario: Fab-FITC de IgG antihumana de cabra conjugado (109-
 25 097-003) de Jackson ImmunoResearch, PA, Estados Unidos de América
 Molécula entera, IgG humana pura Chrome (09-000-003) de Jackson ImmunoResearch, PA, Estados Unidos de América

Anticuerpo terciario: anti-FITC de ratón (ab10257) de Abcam, MA, Estados Unidos de América

Control de isotipo de IgG humano purificado (1-001A) de R&D Systems, MN, Estados Unidos de América

- 5 Tween-20 (BP337-100) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América
Acetona (BP2403-4) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América
polímero conjugado a HRP Dual Link EnVision+, Ratón y Conejo (K4063) de Dako, CA, Estados Unidos de América.

Kit de solución DAB 2 (882014) de Invitrogen, NY, Estados Unidos de América.

- 10 Harris Hematoxilina (23-245-677) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América.

Medio de montaje Faramount (S302580) de Dako, CA, Estados Unidos de América.

Las secciones y grupos de tejidos fueron adquiridos de US Biomax Inc., MD,

- 15 Estados Unidos de América o Origene, MD, Estados Unidos de América.

Preparación de portaobjetos FFPE: Desparafinación y Rehidratación

Los portaobjetos de FFPE fueron desparafinizados en xileno (2 x 3 minutos) luego rehidratados a través de 1:1 xileno: 100% etanol (1 x 3 minutos), 100% etanol (2 x 3 minutos), 95% etanol (1 x 3 minutos), 70% etanol (1 x 3 minutos), 50% etanol (1 x 3 minutos), y agua corriente (1 x 3 minutos).

Preparación de portaobjetos FFPE: Recuperación del Antígeno (Microonda).

- 25 El antígeno LY75 fue recuperado usando calor de microondas, alta potencia hasta ebullición luego baja potencia durante 10 minutos en 50 mL 1x buffer de citrato en una jarra Coplin. Luego, los portaobjetos se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente durante otros 15 min, luego se lavaron en agua corriente, 3 minutos. Se dibujaron círculos alrededor de cada sección de tejido /TMA con una lapicera de

barrera hidrófoba y los portaobjetos luego se lavaron 3 veces en PBS, 3 minutos cada lavado.

Preparación de portaobjetos FF

- 5 Los portaobjetos fueron retirados del almacenamiento a -80°C y se dejaron secar a temperatura ambiente en la campana extractora durante 20–30 minutos. Los portaobjetos fueron fijados durante 10 min en acetona enfriada con hielo a -20°C , luego se dejaron secar durante 20 min en la campana extractora a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron y rehidrataron en PBS, 3 lavados durante 3
- 10 min cada uno. Se delinearon las secciones con una lapicera de barrera hidrófoba.

Preparación de complejos de anticuerpos

- El anticuerpo anti LY75 primario fue diluido en bloque proteico libre de suero (SFPB, por sus siglas en inglés) para obtener una solución con una concentración
- 15 20 veces superior a la concentración final deseada ($20\text{ }\mu\text{g/mL}$ para $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ final). El anticuerpo secundario, fragmento de unión al antígeno (Fab) de inmunoglobulina G (IgG) antihumana de cabra, se preparó de manera similar en SFPB para crear una solución de concentración igual.

- Se combinaron volúmenes iguales de anticuerpos primario y secundario en un
- 20 tubo etiquetado, se mezclaron suavemente, y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente, dando como resultado una concentración de anticuerpo primario 10 veces superior a la concentración final deseada ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$ para $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ final). Esta mezcla se diluyó 1:5 con SFPB, se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, dando como resultado una
- 25 concentración de anticuerpo primario dos veces aquella de la concentración final deseada ($2\text{ }\mu\text{g/mL}$ para $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ final).

Para producir los complejos colorantes finales, se preparó una solución 1% (10

µg/µL) de IgG humana en SFPB y se agregó un volumen igual a la mezcla de anticuerpo primario/ secundario. Esta combinación se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, diluyendo a la mitad la concentración de anticuerpo primario de la mezcla de anticuerpo primario/ secundario y dando como resultado la concentración final deseada de anticuerpo primario (1 µg/mL).

Inmunotinción

Mientras tanto, se bloqueó la actividad de peroxidasa de tejido endógeno incubando los tejidos con supresor de peroxidasa durante 5–10 minutos a TA en una cámara humidificada. Luego, los portaobjetos se lavaron en PBS 3 x 3 minutos cada lavado. Los tejidos se incubaron en SFPB durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Los complejos finales de tinción fueron aplicados a cada sección y/o grupo de tejidos, y los portaobjetos se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Luego, los portaobjetos se lavaron una vez en PBS y una vez en PBST (PBS+0.125% Tween–20), 3 minutos cada lavado. anti-FITC de ratón de anticuerpo terciario, se aplicó a una concentración de 2 µg/mL durante 30 min, temperatura ambiente, en una cámara humidificada. A continuación, las secciones se lavaron una vez en PBS y una vez en PBST, 3 min cada lavado. Luego, se aplicó polímero conjugado a HRP antiratón/conejo Dual Link EnVision+ a los tejidos y los portaobjetos se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Luego los portaobjetos se lavaron una vez en PBS, una vez en PBST, 3 minutos cada lavado. Los tejidos se incubaron en solución DAB preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, los portaobjetos se lavaron una vez en agua corriente de la canilla durante 2 minutos y una vez en PBS durante 3 minutos. Los portaobjetos se contratiñeron con Hematoxilina durante 30 segundos a

temperatura ambiente, y se lavaron con agua potable. Los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se montaron luego cubreobjetos sobre los portaobjetos usando medio de montaje Faramount.

5 *Resultados*

LY75_A1 mostró positividad en muestras de FFPE de Cáncer Mamario Triple Negativo, donde 77% de las secciones mostraron tinción positiva y el 55% exhibió tinción fuerte (+++).

La tinción para LY75 en tejidos normales FF era generalmente ausente a baja. El
 10 epitelio ductal de la mama, glándula salivar, y páncreas exhibió una marcada tinción de baja a moderada, y el bazo dio una tinción baja positiva. Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos contra LY75 pueden tener utilidad como agentes terapéuticos y de diagnóstico en algunos de los cánceres ensayados y posiblemente en otros tipos de cánceres que muestran expresión de LY75.

15

Ejemplo 4: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 en Células HT-29

Materiales

Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher
 20 Scientific, PA, Estados Unidos de América

PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

25 Título Celular Glo (G7572) de Promega, WI, Estados Unidos de América

Método

Las células fueron disociadas usando un separador celular y se contaron. Se

centrifugaron 5×10^3 células / pocillo en un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del tiempo de duplicado de las células, tales como 10×10^3 células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de 1×10^5 células/mL.

- 5 Se agregó 50 μ L/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos, de lados blancos y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y se titularon hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos o medios diluidos (para las muestras no tratadas) (50 μ L/pocillo) fueron agregados a
- 10 los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200 μ L/pocillo) a las hileras y columnas de afuera de la placa para evitar la evaporación. La placa se incubó durante 72h a 37°C.

- La placa fue retirada del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa fue
- 15 inclinada y lavada 1x con 100 μ L/pocillo de PBS (para células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se agregaron 100 μ L/pocillo de PBS y 100 μ L Cell titer glo a cada pocillo y se trituró para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó por microscopia para asegurar que se produjera una lisis celular
 - 20 eficaz. A continuación, la placa fue leída en un luminómetro Glomax.

Resultados

- Los resultados ilustrados en la Figura 3a muestran una subpoblación de anticuerpos, que se sabe que se unen a LY75, los cuales pueden inducir la muerte celular de células HT–29. Esto sugiere que si bien los anticuerpos se
- 25 pueden unir a LY75 solamente unos pocos exhiben eficacia cuando se conjugan a DM1. Luego, los anticuerpos fueron seleccionados de la subpoblación para posterior análisis de actividad citotóxica.

Ejemplo 5: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM4 y Conjugados a DM1 en Células de cáncer colorrectal

Materiales

- 5 Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT–25–056CI) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América
- PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América
- Medio RPMI 1640 (MT–10–041–CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de
- 10 América
- Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, USA

Método

- Las células fueron disociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5e3 células/pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en
- 15 suspensión, se puede utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las células, tales como 10e3 células/pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de cultivo hasta una concentración de 1e5 células/mL.

- Se agregaron 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos, de fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron
- 20 diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o medio (para las muestras no tratadas) (50ul/pocillo) fueron agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a las hileras exteriores y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa
 - 25 se incubó durante 72h a 37C.

La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se

movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se agregó 100ul/pocillo de PBS y 100ul Cell titer glo a cada pocillo y se trituró para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 5 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

Resultados

La Figura 3b muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células HT-29. Estos resultados demuestran un aumento de 10 la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpos y otros anticuerpos anti LY75 conjugados a una toxina (seleccionada del Ejemplo 1).

Ejemplo 6: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Líneas Celulares de Linfoma

15 *Materiales*

Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

20 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, USA

Método

Las células fueron disociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5e3 25 células/ pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las células, tales como 10e3 células/ pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de

cultivo hasta una concentración de 1×10^5 células/mL.

Se agregó 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o medio (para las muestras sin tratar) (50ul/pocillo) fueron agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a las hileras de afuera y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa fue incubada durante 72h a 37C.

La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se agregaron 100ul/pocillo de PBS y 100ul Cell titer glo a cada pocillo y se trituro para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

Resultados

La Figura 3c muestra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células RAJI. La Figura 3d muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células Namalwa. La Figura 3e muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células Karpas 299. Estos resultados demuestran un aumento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpos y otros anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 (seleccionado del Ejemplo 1).

Ejemplo 7: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Líneas de Células de Cáncer pancreático

Materiales

- Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT–25–056CI) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América
- 5 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América
- Medio RPMI 1640 (MT–10–041–CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América
- 10 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, Estados Unidos de América

Método

- Las células fueron disociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5e3 células/ pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las
- 15 células, tales como 10e3 células/ pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de cultivo hasta una concentración de 1e5 células/mL.

- Se agregaron 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a
- 20 concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o medio (para las muestras sin tratar) (50ul/pocillo) fueron agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a las hileras de afuera y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa fue incubada durante 72h a 37C.
- 25 La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en

suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se agregaron 100ul/pocillo de PBS y 100ul de Cell titer glo a cada pocillo y se trituro para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

Resultados

La Figura 3f muestra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células BxPC3. La Figura 3g muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células HupT4. La Figura 3h muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células HPAAFFII. Estos resultados demuestran un incremento en la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpos y de otros anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 (seleccionado del Ejemplo 1).

Ejemplo 8: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Líneas Celulares de Leucemia Linfocítica Crónica

Materiales

20 Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

25 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, Estados Unidos de América

Método

Las células fueron disociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5×10^3 células/ pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las células, tales como 10×10^3 células/ pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de cultivo hasta una concentración de 1×10^5 células/mL.

Se agregaron 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o el medio (para las muestras sin tratar) (50ul/pocillo) fueron agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a las hileras de afuera y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa fue incubada durante 72h a 37°C.

La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se agregaron 100ul/pocillo de PBS y 100ul de Cell titer glo a cada pocillo y se trituró para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

Resultados

La Figura 3i muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células EHEB. La Figura 3j muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células Mec-1. Estos resultados demuestran un aumento de la actividad citotóxica proporcional a la

concentración de anticuerpos y de otros anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 (seleccionados del Ejemplo 1).

Ejemplo 9: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Líneas Celulares de Leucemia Monocítica Aguda

Materiales

Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, Estados Unidos de América

Método

Las células fueron disociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5e3 células/ pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las células, tales como 10e3 células/ pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de cultivo hasta una concentración de 1e5 células/mL.

Se agregaron 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o medio (para las muestras sin tratar) (50ul/pocillo) fueron agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a las hileras de afuera y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa fue incubada durante 72h a 37C.

La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se
 5 agregaron 100ul/pocillo de PBS y 100ul de Cell titer glo a cada pocillo y se trituró para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

10 *Resultados*

La Figura 3k muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células AML–193. Estos resultados demuestran un aumento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpos y de otros anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 (seleccionados del Ejemplo 1).

15

Ejemplo 10: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Líneas Celulares de Cáncer Mamario

Materiales

Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT–25–056CI) de Fisher
 20 Scientific, PA, Estados Unidos de América

PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Medio RPMI 1640 (MT–10–041–CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

25 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, Estados Unidos de América

Método

Las células fueron disociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5e3

células/ pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las células, tales como 10×10^3 células/ pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de cultivo hasta una concentración de 1×10^5 células/mL.

- 5 Se agregaron 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o medio (para las muestras sin tratar) (50ul/pocillo) fueron
10 agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a las hileras de afuera y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa fue incubada durante 72h a 37C.

- La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se
15 movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se agregaron 100ul/pocillo de PBS y 100ul de Cell titer glo a cada pocillo y se trituro para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se
20 produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

Resultados

- La Figura 3l muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células HCC 70 (ER negativas, PR negativas y Her2
25 negativas). La Figura 3m muestra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células HCC 1806 (ER negativas, PR negativas y Her2 negativas). La Figura 3n muestra la actividad citotóxica de

anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células MDA–MB–468. Estos resultados demuestran un aumento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpos.

5 Ejemplo 11: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Líneas Celulares de Cáncer de Vejiga

Materiales

Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT–25–056CI) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

10 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Medio RPMI 1640 (MT–10–041–CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, Estados Unidos de América

15 *Método*

Las células fueron disociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5e3 células/ pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las células, tales como 10e3 células/ pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de cultivo hasta una concentración de 1e5 células/mL.

20 Se agregaron 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o medio (para las muestras sin tratar) (50ul/pocillo) fueron
25 agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a las hileras de afuera y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa

fue incubada durante 72h a 37C.

La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se agregaron 100ul/pocillo de PBS y 100ul de Cell titer glo a cada pocillo y se trituró para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

Resultados

La Figura 3o muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células RT4. La Figura 3p muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células 5637. La Figura 3q muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células SW780. Estos resultados demuestran un aumento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpos.

Ejemplo 12: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Líneas Celulares de Cáncer de Cabeza y Cuello

Materiales

Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, Estados Unidos de América

Método

Las células fueron disociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5e3 células/ pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las células, tales como 10e3 células/ pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de cultivo hasta una concentración de 1e5 células/mL.

Se agregaron 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o medio (para las muestras sin tratar) (50ul/pocillo) fueron agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a las hileras de afuera y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa fue incubada durante 72h a 37C.

La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se agregaron 100ul/pocillo de PBS y 100ul de Cell titer glo a cada pocillo y se trituro para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

Resultados

La Figura 3r muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células SCC–9. Estos resultados demuestran un aumento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpos.

5 Ejemplo 13: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Líneas Celulares de Cáncer Esofágico

Materiales

Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT–25–056CI) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

10 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Medio RPMI 1640 (MT–10–041–CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, Estados Unidos de América

15 *Método*

Las células fueron disociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5e3 células/ pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las células, tales como 10e3 células/ pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de cultivo hasta una concentración de 1e5 células/mL.

20 Se agregaron 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o medio (para las muestras sin tratar) (50ul/pocillo) fueron
25 agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a

las hileras de afuera y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa fue incubada durante 72h a 37C.

La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se
 5 movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se agregaron 100ul/pocillo de PBS y 100ul de Cell titer glo a cada pocillo y se trituró para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se
 10 produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

Resultados

La Figura 3s muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células OE 19. Estos resultados demuestran un aumento de
 15 la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpos.

Ejemplo 14: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Líneas Celulares de Cáncer Ovárico

Materiales

20 Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América
 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de
 25 América
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, Estados Unidos de América

Método

Las células fueron dissociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5×10^3 células/pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las células, tales como 10×10^3 células/pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de cultivo hasta una concentración de 1×10^5 células/mL.

Se agregaron 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o medio (para las muestras sin tratar) (50ul/pocillo) fueron agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a las hileras de afuera y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa fue incubada durante 72h a 37C.

La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se agregaron 100ul/pocillo de PBS y 100ul de Cell titer glo a cada pocillo y se trituro para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

Resultados

La Figura 3t muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células OVCAR–3. La Figura 3u muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células SK–OV–3.

Estos resultados demuestran un aumento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpos.

Ejemplo 15: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Líneas Celulares de Mieloma Múltiple

Materiales

Separador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, Estados Unidos de América

Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, Estados Unidos de América

Método

- 15 Las células fueron disociadas usando un separador celular y fueron contadas. 5e3 células/ pocillo fueron centrifugadas para formar un pellet (para células en suspensión, se pueden utilizar más dependiendo del doble de tiempo de las células, tales como 10e3 células/ pocillo). El pellet fue resuspendido en medio de cultivo hasta una concentración de 1e5 células/mL.
- 20 Se agregaron 50ul/pocillo de suspensión celular a pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo transparente y laterales blancos. Los anticuerpos fueron diluidos y titulados hasta 8 puntos (títulos de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0–20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Los anticuerpos diluidos o medio (para las muestras sin tratar) (50ul/pocillo) fueron
- 25 agregados a los pocillos apropiados. Se agregó medio en exceso (200ul/pocillo) a las hileras de afuera y columnas de la placa para evitar la evaporación. La placa fue incubada durante 72h a 37C.

La placa se retiró del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto la solución Cell Titer Glo se descongeló. La placa se movió rápidamente y se lavó 1x con 100ul/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifuga en primer lugar para peletizar las células). Se
 5 agregaron 100ul/pocillo de PBS y 100ul de Cell titer glo a cada pocillo y se trituro para mezclar. La placa fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para asegurar que se produjera la lisis celular eficaz. Luego, se leyó la placa en un luminómetro Glomax.

10 *Resultados*

La Figura 3v muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células MOLP-8. La Figura 3w muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti LY75 conjugados a DM1 y DM4 hacia células RPMI8226. Estos resultados demuestran un aumento de la actividad citotóxica proporcional a
 15 la concentración de anticuerpos.

Ejemplo 16: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Modelos de Xenoinjerto Raji

La eficacia de LY75_DM1 y LY75_DM4 fue analizada en un modelo de
 20 xenoinjerto en ratón SCID de linfoma de Raji Burkitt subcutáneo.

Los ratones SCID inmunodeficientes fueron inoculados subcutáneamente con células tumorales Raji (linfoma de Burkitt humano). Los tumores se dejaron establecer y los ratones fueron distribuidos en cinco grupos de tratamiento de 3–6 ratones por grupo. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó un tamaño
 25 promedio de 129–132 mm³ por grupo, cada grupo fue tratado con uno de los siguientes compuestos, administrado por vía intravenosa a las dosis indicadas: Grupo 1 (Vehículo; solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en

inglés)); Grupo 2 (LY75_DM1; 10 mg/kg), Grupo 3 (Control isotipo–DM1; 10 mg/kg), Grupo 4 (LY75_DM4; 5 mg/kg), Grupo 5 (isotipo control–SPBDDM4; 5 mg/kg). Se administró una segunda dosis una semana después. Se monitorearon los pesos corporales (BW, por sus siglas en inglés), los ratones fueron
 5 examinados frecuentemente para controlar los efectos colaterales adversos y la salud, y se midieron los tumores dos veces a la semana. Los ratones fueron sometidos a eutanasia cuando sus tumores alcanzaron el criterio de valoración del volumen tumoral de 2000 mm³ o después de 60 días, lo que ocurría primero. Se determinó la eficacia del retardo de crecimiento del tumor (TGD, por sus siglas en inglés), el aumento del tiempo hasta el criterio de valoración (TTE, por sus
 10 siglas en inglés) y a partir del análisis de rango logarítmico (logrank) de las diferencias en las curvas de supervivencia Kaplan Meier en ratones tratados con ADC en comparación con ratones tratados con PBS. Se obtuvieron muestras de los primeros cinco ratones control tratados con vehículo en alcanzar el criterio de valoración para tumores que fueron procesados por fijación a formalina e
 15 incrustados en parafina.

Resultados

La Figura 4a muestra que cada uno de LY75_DM1 y LY75_DM4 demostró actividad antitumoral significativa y supervivencia significativamente extendida en
 20 el modelo de xenoinjerto en ratón SCID de linfoma de Raji Burkitt en comparación con los controles; sin embargo, las dosis de 5 mg/kg de LY75_DM4 fueron significativamente más eficaces que las dosis de 10 mg/kg de LY75_DM1, dando como resultado 5 de 6 ratones con regresión tumoral completa aunque transitoria. Todos los tratamientos fueron bien tolerados y no se observó signo clínico alguno
 25 de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial para ADCs dirigidos hacia LY75, por ejemplo LY75_DM1 y LY75_DM4, para proporcionar un beneficio clínico en el tratamiento de pacientes con cáncer de linfoma no Hodgkin humano.

Ejemplo 17: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Modelos de Xenoinjerto Namalwa

Se ensayó la eficacia de LY75_DM1 y LY75_DM4 en un modelo de xenoinjerto en ratón SCID de linfoma de Namalwa Burkitt subcutáneo.

- 5 Ratones SCID inmunodeficientes fueron inoculados subcutáneamente con células tumorales de Namalwa (linfoma de Burkitt humano). Los tumores se dejaron establecer y los ratones fueron distribuidos en cinco grupos de tratamiento de 6 ratones por grupo. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó un tamaño promedio de 114 mm³ por grupo, cada grupo fue tratado con uno de los
- 10 siguientes compuestos, administrado intravenosamente en las dosis indicadas: Grupo 1 (Vehículo; solución salina tamponada con fosfato (PBS)); Grupo 2 (LY75_DM1; 10 mg/kg), Grupo 3 (Isotipo control–DM1; 10 mg/kg), Grupo 4 (LY75_DM4; 5 mg/kg), Grupo 5 (Isotipo control–SPBDDM4; 5 mg/kg). Se
- 15 monitorearon los pesos corporales (BW), los ratones fueron examinados con frecuencia para determinar su salud y los efectos colaterales adversos, y los tumores fueron medidos dos veces a la semana. Los ratones fueron sometidos a eutanasia cuando sus tumores alcanzaron el criterio de valoración del volumen tumoral de 2000 mm³ o después de 60 días, lo que ocurra primero. La eficacia
- 20 fue determinada a partir del retardo del crecimiento tumoral (TGD), el aumento en el tiempo medio hasta el criterio de valoración (TTE), y a partir del análisis de rango logarítmico de las diferencias en las curvas de supervivencia Kaplan Meier en ratones tratados con ADC en comparación con aquellos tratados con PBS. Se
- 25 obtuvieron muestras de los primeros cinco ratones controles tratados con vehículo en alcanzar el criterio de valoración para tumores que fueron procesados mediante fijación a formalina e incrustados en parafina.

Resultados

La Figura 4b muestra que cada uno de LY75_DM1 y LY75_DM4 demostró una actividad antitumoral y extensión de la supervivencia significativas en el modelo de xenoinjerto en ratones SCID de linfoma de Namalwa Burkitt en comparación con los controles; sin embargo, la dosis de 5 mg/kg LY75_DM4 fue
 5 significativamente más eficaz que la dosis de 10 mg/kg de LY75_DM1, causando una breve reducción en el volumen tumoral. Todos los tratamientos fueron bien tolerados y no se observó signo clínico alguno de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial para ADCs dirigidos hacia LY75, por ejemplo LY75_DM1 y LY75_DM4, para proporcionar un beneficio clínico en el tratamiento de pacientes
 10 con cáncer de linfoma no Hodgkin humano.

Ejemplo 18: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Modelos de Xenoinjerto de Cáncer Pancreático

La eficacia de LY75_DM1 y LY75_DM4 fue ensayada en el modelo de xenoinjerto
 15 en ratones desnudos atímicos de adenocarcinoma pancreático HPAFII subcutáneo.

Se inocularon ratones desnudos atímicos inmunodeficientes subcutáneamente con células tumorales HPAFII (adenocarcinoma pancreático humano). Los tumores se dejaron establecer y los ratones fueron distribuidos en cinco grupos de
 20 tratamiento de 6 ratones por grupo. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó un tamaño promedio de ~114 mm³/grupo, cada grupo fue tratado con uno de los siguientes compuestos, administrado intravenosamente en las dosis indicadas: Grupo 1 (Vehículo; solución salina tamponada con fosfato (PBS)); Grupo 2 (LY75_DM1; 10 mg/kg), Grupo 3 (Isotipo control-DM1; 10 mg/kg), Grupo 4
 25 (LY75_DM4; 5 mg/kg), Grupo 5 (Isotipo control-SPBDDM4; 5 mg/kg). Se monitorearon los pesos corporales (BW, por sus siglas en inglés), los ratones fueron examinados con frecuencia para determinar su salud y los efectos

colaterales adversos, y los tumores se midieron tres veces a la semana. Los ratones fueron sometidos a eutanasia cuando sus tumores alcanzaron el criterio de valoración del volumen tumoral de 2000 mm³ o después de 90 días, lo que ocurriese primero. Se determinó la eficacia a partir del efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral y a partir del análisis de rango logarítmico de las diferencias en curvas de supervivencia Kaplan–Meier en ratones tratados con ADC o con PBS. Se obtuvieron muestras de tumores de ratones control tratados con vehículo y se procesaron mediante fijación a formalina y se incrustaron en parafina.

10 *Resultados*

La Figura 4c muestra que LY75_DM1 y LY75_DM4 exhibieron actividad antitumoral significativa y similarmente potente y extensión de la supervivencia en el modelo de xenoinjerto de ratón desnudo HPAFII en comparación con los controles. Todos los tratados fueron bien tolerados y no se observaron signos clínicos de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial para ADCs dirigidos hacia LY75, por ejemplo LY75_DM1 y LY75_DM4, para proporcionar un beneficio clínico en el tratamiento de pacientes humanos con cáncer pancreático.

20 Ejemplo 19: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Modelos de Xenoinjerto de Cáncer de Vejiga

Se ensayó la eficacia de LY75_DM1 y LY75_DM4 en el modelo de xenoinjerto en ratón SCID con carcinoma de vejiga humano SW780 subcutáneo.

Los ratones desnudos atímicos inmunodeficientes fueron inoculados subcutáneamente con células tumorales HPAFII (adenocarcinoma pancreático humano). Se dejó que los tumores se establecieran y los ratones fueron distribuidos en cinco grupos de tratamiento de 6 ratones por grupo. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó un tamaño promedio de ~114 mm³/grupo, cada

grupo fue tratado con uno de los siguientes compuestos, administrado intravenosamente en las dosis indicadas: Grupo 1 (Vehículo; solución salina tamponada con fosfato (PBS)); Grupo 2 (LY75_DM1; 1 mg/kg), Grupo 3 (LY75_DM1; 2,5 mg/kg), Grupo 4 (LY75_DM1; 5 mg/kg), Grupo 5 (LY75_DM4; 1 mg/kg)), Grupo 6 (LY75_DM4; 2,5 mg/kg)), Grupo 7 (LY75_DM4; 5 mg/kg)), Grupo 8 (Isotipo control–SPBDDM4; 5 mg/kg). Se monitorearon los pesos corporales (BW, por sus siglas en inglés), los ratones fueron examinados con frecuencia para determinar su salud y los efectos colaterales adversos, y se midieron los tumores tres veces a la semana. Los ratones fueron sometidos a eutanasia cuando sus tumores alcanzaron el criterio de valoración del volumen tumoral de 2000 mm³ o después de 90 días, lo que ocurriese primero. Se determinó la eficacia a partir del efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral y a partir del análisis del rango logarítmico de las diferencias en las curvas de supervivencia Kaplan–Meier en ratones tratados con ADC o con PBS. Se obtuvieron muestras de tumores de los ratones control tratados con vehículo y se procesaron mediante fijación a formalina y se incrustaron en parafina.

Resultados

La Figura 4d muestra que LY75_DM1 y LY75_DM4 exhibieron actividad antitumoral significativa y similarmente potente y extensión de la supervivencia en el modelo de xenoinjerto de ratones desnudos SW780 en comparación con los controles. Todos los tratamientos fueron bien tolerados y no se observaron signos clínicos de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial de ADCs dirigidos hacia LY75, por ejemplo LY75_DM1 y LY75_DM4, para proporcionar un beneficio clínico en el tratamiento de pacientes humanos con cáncer de vejiga.

Ejemplo 20: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Modelos de Xenoinjerto de Cáncer Mamario

Se analizó la eficacia de LY75_DM1 y LY75_DM4 en el modelo de xenoinjerto en ratones desnudos atímicos MDA–MB–468 subcutáneo.

Los ratones desnudos atímicos inmunodeficientes fueron inoculados subcutáneamente con células tumorales MDA–MB–468 (adenocarcinoma de mama triple negativo humano). Se dejó que los tumores se establecieran y los ratones fueron distribuidos en siete grupos de tratamiento de 10 ratones por grupo. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó un tamaño promedio de 167 mm³ por grupo, cada grupo fue tratado con uno de los siguientes compuestos, administrado intravenosamente en las dosis indicadas: Grupo 1 (Vehículo; 20 mM de succinato sódico, pH 5,0, 6% trehalosa, 0,04% polisorbato); Grupo 2 (LY75_DM1; 5 mg/kg), Grupo 3 (LY75_DM1; 10 mg/kg), Grupo 4 (LY75_DM4; 5 mg/kg), Grupo 5 (LY75_DM4; 2,5 mg/kg), Grupo 6 (LY75_DM4; 1 mg/kg), Grupo 7 (Isotipo control–DM4; 5 mg/kg). Se monitorearon los pesos corporales (BW, por sus siglas en inglés), los ratones fueron examinados con frecuencia para determinar su salud y los efectos colaterales adversos, y los tumores fueron medidos dos veces a la semana. Los ratones fueron sometidos a eutanasia 82 días después de la inoculación tumoral. Se determinó la eficacia a partir de la actividad antitumoral (tamaño tumoral medio en grupos de tratamiento/ tamaño tumoral medio en grupo control x 100) y el aumento en tiempo medio hasta criterio de valoración (TTE, por sus siglas en inglés) en ratones tratados con ADC en comparación con los tratados con PBS. Se obtuvieron muestras de los cinco tumores más grandes en los ratones control tratados con vehículo en el día 71 luego de la inoculación y se procesaron mediante fijación con formalina y se incrustaron en parafina.

25 *Resultados*

La Figura 4e muestra que LY75_DM1 y LY75_DM4 cada uno demostró actividad antitumoral dramática en el modelo de xenoinjerto en ratones desnudos MDA–

MB-468 en comparación con los controles. Se observó la actividad dependiente de la dosis con LY75_DM4, donde 2,5 y 5 mg/kg eran mucho más potentes que 1 mg/kg. A 5 mg/kg, LY75_DM1 y LY75_DM4 tenían una eficacia similar. Se observaron regresiones sostenidas en el volumen tumoral medio para LY75_DM1 a 10 y 5 mg/kg y LY75_DM4 a 5 y 2,5 mg/kg. Todos los tratamientos fueron bien tolerados y no se observaron signos clínicos de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial de ADCs dirigidos hacia LY75, por ejemplo LY75_DM1 y LY75_DM4, para proporcionar un beneficio clínico en el tratamiento de pacientes humanos con cáncer mamario triple negativo.

10

Ejemplo 21: Eficacia de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Modelos de Xenoinjerto de Cáncer Colorrectal

Se ensayó la eficacia de LY75_DM1 y LY75_DM4 en el modelo de xenoinjerto en ratones desnudos atímicos con adenocarcinoma colorrectal COLO205 subcutáneo.

15

Los ratones desnudos atímicos inmunodeficientes fueron inoculados subcutáneamente con células tumorales COLO205 (adenocarcinoma colorrectal humano). Se dejó que los tumores se establecieran y los ratones fueron distribuidos en cinco grupos de tratamiento de 6 ratones por grupo. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó un tamaño promedio de 117 mm³ por grupo, cada grupo fue tratado con uno de los siguientes compuestos, administrado intravenosamente en las dosis indicadas: Grupo 1 (Vehículo; solución salina tamponada con fosfato (PBS)); Grupo 2 LY75_DM1; 10 mg/kg), Grupo 3 (Isotipo control-DM1; 10mg/kg), Grupo 4 (LY75_DM4; 5 mg/kg), Grupo 5 (Isotipo control-DM4; 5 mg/kg). Se administró una segunda dosis doce días después de la primera. Se monitorearon los pesos corporales (BW, por sus siglas en inglés), los ratones fueron examinados con frecuencia para determinar su salud y los efectos

20

25

colaterales adversos, y los tumores fueron medidos dos veces a la semana. Los ratones fueron sometidos a eutanasia cuando sus tumores alcanzaron el criterio de valoración del volumen tumoral de 1000 mm³ o después de 60 días, lo que ocurra primero. La eficacia fue determinada a partir del retardo del crecimiento tumoral (TGD), el aumento en el tiempo medio hasta el criterio de valoración (TTE) y a partir del análisis del rango logarítmico de las diferencias en las curvas de supervivencia Kaplan Meier en ratones tratados con ADC en comparación con aquellos tratados con PBS. Se obtuvieron muestras de los primeros cinco ratones controles tratados con vehículo en alcanzar el criterio de valoración para tumores que fueron procesados mediante fijación a formalina e incrustados en parafina.

Resultados

La Figura 4f muestra que LY75_DM1 y LY75_DM4 exhibieron actividad antitumoral modesta similar y extensión de la supervivencia en el modelo de xenoinjerto en ratones desnudos con adenocarcinoma colorrectal COLO205 en comparación con los controles. Todos los tratamientos fueron bien tolerados y no se observaron signos clínicos de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial de ADCs dirigidos hacia LY75, por ejemplo LY75_DM1 y LY75_DM4, para proporcionar un beneficio clínico en el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal humano.

20

Ejemplo 22: Toxicidad de Anticuerpos Monoclonales Anti LY75 Conjugados a DM1 y Conjugados a DM4 en Monos Cynomolgus

Seis monos machos fueron asignados al estudio con 2 monos /grupo. Se administró ya sea vehículo (PBS), LY75_DM4 (disociable) o LY75_DM1 (no disociable) dos veces (en el Día 1 y en el Día 29) por una infusión intravenosa de 15 minutos a 0 mg/kg/dosis (PBS, vehículo), 5 mg/kg/dosis (LY75_DM4, disociable) o 10 mg/kg/dosis (LY75_DM1, no disociable). Se recogieron muestras

25

de sangre para evaluaciones toxicocinéticas con anterioridad al inicio de la dosis (Día 1), y 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28 días luego de cada dosis. Se recogieron muestras de sangre para análisis patológicos clínicos con anterioridad al inicio de la dosis (Día 1), y 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días luego de cada dosis (28 días luego de la primera dosis también se sirvió como el punto en el tiempo pre-dosis para la segunda dosis). Todos los animales del estudio fueron sometidos a eutanasia y a necropsia luego de la extracción final de sangre en el Día 57. El plasma separado de cada extracción de sangre fue aislado, congelado y transportado a Oxford BioTherapeutics, Inc. para ser analizado para determinar la concentración de ADC por ELISA.

Los hallazgos patológicos clínicos relacionados con el tratamiento incluyeron una anemia regenerativa leve y disminuciones transitorias en el perfil de leucocitos en sangre más notablemente en los recuentos de neutrófilos. Se observó anemia tanto en los animales tratados con 5 mg/kg de LY75_DM4 como en uno de los dos animales tratados con 10 mg/kg de LY75_DM1. Se observó neutropenia severa con un nadir en una semana posdosis y se observó una rápida recuperación en los recuentos en todos los animales; el nadir en el recuento de neutrófilos absoluto fue más bajo en los animales tratados con LY75_DM4. No hubo efectos relacionados con el artículo bajo estudio sobre los parámetros de coagulación APTT y PT. Los cambios en la química del suero incluyeron aumentos transitorios en AST, CK, LDH (en 1 de 2 animales en cada grupo de tratamiento) y en la globulina luego de la administración de 5 mg/kg de LY75_DM4 y 10 mg/kg de LY75_DM1. Por añadidura, se observó un aumento transitorio en el ALT de enzimas específicas hepáticas solamente en los animales tratados con LY75_DM4. La corta duración de, y/o la magnitud de los aumentos en los parámetros químicos sugieren que no fueron adversos. No hubo hallazgos en los análisis de orina relacionados con el artículo de ensayo. Luego del examen

- en necropsia luego de un período de recuperación de 4 semanas no hubo hallazgos patológicos macroscópicos relacionados con el tratamiento o cambios en los pesos orgánicos absoluto y relativo. Los hallazgos histopatológicos solamente en la glándula tiroidea (una alteración en la morfología coloidal en los folículos) y en el riñón (túbulos dilatados en la corteza externa), fueron
- 5 considerados de severidad mínima; no asociados con los cambios en otros parámetros de estudio; y, no adversos y de importancia toxicológica mínima. Conclusión: El tratamiento de dosis repetidas con dos dosis de 5 mg/kg de LY75_DM4 o 10 mg/kg de LY75_DM1 fue bien tolerado en monos cynomologus.
- 10 Todos los hallazgos de toxicidad relacionados con el tratamiento eran reversibles luego de un período de recuperación de 4 semanas.

- Ejemplo 23: Caracterización de epítomos de LY75_A1 mediante Análisis de unión con Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) competitiva
- 15

Método

- Células COLO205 (ATCC, catálogo # CCL-222) fueron desprendidas de frascos de cultivo tisular con el Separador Celular ("Cell Stripper") (Cellgro, catálogo #
- 20 MT-25-056CI). Las células se lavaron y resuspendieron en buffer FACS (PBS + 2%FBS), se neutralizaron con medio de crecimiento, y se contaron. Las células se colocaron en placas a 50.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de Fondo en V. Las células se lavaron una vez con buffer de FACS (PBS (Fisher, catálogo # SH30028-03) + 2% FBS). Se agregó un mAb anti LY75 (Seleccionado
- 25 del Ejemplo 1) o LY75_A1 a pocillos comenzando en 250 nM y se diluyeron en forma seriada 3 veces y se aplicaron a los pocillos relevantes durante 45 minutos en hielo. Los pocillos de ensayo que requirieron un paso o varios pasos de tinción

se dejaron en buffer de FACS según lo apropiado para asegurar que se había completado la tinción final de manera simultánea para todas las condiciones ensayadas. Dos pocillos quedaron sin teñir en buffer de FACS como controles.

Después de la incubación con anticuerpo de bloqueo, las células se lavaron dos veces en buffer de FACS. Las células fueron resuspendidas en buffer de FACS que contenía el mAb anti LY75 conjugado a MCC-DM1 (1 nM) y se incubaron en hielo durante 45 minutos. Las células se lavaron como se describió anteriormente y se resuspendieron en buffer de FACS más 1 ug/ml de anticuerpo anti-maitansina de ratón y se incubaron en hielo durante 45 minutos. Las células se lavaron según lo descrito con anterioridad y se resuspendieron en buffer de FACS que contenía 2 ug/ml de RPE kappa antiratón de cabra. Las células se incubaron en hielo durante 45 minutos y luego se lavaron según lo descrito con anterioridad. Las células se resuspendieron en buffer de FACS a 200 ul por pocillo. La intensidad media de fluorescencia de cada muestra se determinó usando un Citómetro de Flujo Guava EasyCyte Plus HT Flow Cytometer (formatos de placas de 96 pocillos) y se analizaron los datos sin elaborar usando el Guava Cytosoft.

Resultados

La Figura 5a muestra que el bloqueo con el anti LY75-mAb-MCC-DM1 redujo la unión del mAb anti LY75. El análisis de la unión de LY75_A1 a células COLO205 mostró que LY75_A1 es incapaz de bloquear la unión de anti LY75-mAb-MCC-DM1 (véase la Figura 5b). Por lo tanto, se puede determinar que el mAb anti LY75 y LY75_A1 son anticuerpos no competitivos y LY75_A1 reconoce un epítipo diferente y único de LY75 a aquel de otros anticuerpos anti LY75.

25

Ejemplo 24 Caracterización de Epítipo de LY75 A1 mediante ensayo de microarreglos de péptidos.

Métodos

El análisis de microarreglos de péptidos fue llevado a cabo por LC Sciences, Houston TX, brevemente, el método comprendía los siguientes pasos:– Péptidos 8meros contiguos de proteína LY75 que tenían una superposición de aminoácidos que abarcaba a los residuos 216 a 1666 de la proteína LY75 de longitud completa se sintetizaron e inmovilizaron en un chip de microarreglos. El chip comprendía tres paneles de modo que el experimento se llevó a cabo por triplicado. El microarreglo fue encarado con LY75_A1 para identificar los péptidos a los cuales se unió el anticuerpo. El ensayo de unión se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

El microarreglo que comprende los péptidos contiguos por triplicado se lavó con 1 mL de buffer de unión a 4 °C durante 20 min. Luego se incubó con 1 µg/mL de LY75_A1 en buffer de unión (pH 7.0) a 4 °C durante 2 hrs. El arreglo fue lavado nuevamente con 0,5 mL de buffer de lavado a 4 °C durante 30 min y luego se incubó con 25 ng/mL de conjugado Alexa 647 de IgG antihumana en buffer de unión (pH 7.0) a 4 °C durante 1 hr. El arreglo fue nuevamente lavado con 0,5 mL de buffer de lavado a 4 °C durante 30 min.

A continuación el arreglo fue barrido a 635 nm y PMT 500 y la intensidad de señal fue registrada. El péptido fue clasificado como detectable si estaba presente en por lo menos 2/3 de los duplicados legales. La intensidad de señal promedio de las replicaciones se reportó como la intensidad de señal final.

Resultados

Como puede observarse a partir de la Figura 6 el anticuerpo LY75_A1 mostró unión específica a una cantidad de péptidos situados en el arreglo. La señal máxima observada para la unión de LY75_A1 fue 25000 (escala 1–65535), siendo la señal promedio para todos los puntos en el arreglo de aproximadamente 885.

Se fijó una intensidad de señal de 3000 como el corte de fondo (“background cut”) de punto para la unión no específica. En base al nivel de intensidad de señal de unión del anticuerpo observado se identificaron potenciales secuencias que formaban el epítipo para LY75_A1. Estas regiones son mostradas en las Figuras 6a – 6j y como SEC ID NOs: 22–31.

Ejemplo 25 ensayo de interacción y precipitación (“pull down”) de péptidos LY75_A1

Método

1.1 Ensayo de interacción y precipitación (“pull down”)

La proteína LY75 recombinante fue digerida mediante proteólisis trípica en perla (“on-bead”) (Promega, US). Los péptidos de digestión resultantes fueron recuperados usando una columna de captura C18 (Thermo Fisher Scientific). Luego, los péptidos purificados fueron incubados con 200 µl de perlas de proteína A entrecruzadas con anticuerpo LY75A1 durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se recogieron los péptidos no unidos y se lavaron las perlas con 1 ml de PBS dos veces. Los péptidos unidos al anticuerpo fueron eluidos de las perlas calentándolas a 90°C en 100 µl de PBS durante 5 minutos. Este paso de elución fue repetido.

1.2 *Espectrometría de masas*

Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida – espectrometría de masas usando un Sistema UPLC nanoACQUITY de Waters equipado con una columna C18 nanoACQUITY UPLC BEH 130, 75 µm x 250mm (186003545) y un LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos fueron eluidos con un gradiente de 300nl/min aumentando de 3% a 35% de acetonitrilo durante 120 min. Los espectros de masas de barrido completo fueron adquiridos a 60000 de potencia de resolución entre 400–2000 m/z rango de masa en el Orbitrap. En

cada ciclo, se seleccionaron los veinte péptidos más intensos para barridos CID MS/MS en la trampa de iones lineal con fuente de iones por nanopulverización adaptada en el instrumento.

1.3 *Análisis de secuencias de aminoácidos de péptido*

5 Los datos sin elaborar del equipo LTQ Orbitrap Velos fueron procesados a través del programa informático Mascot (Matrix Science) el cual emplea el algoritmo Mowse (Curr Biol. 1 de junio de 1993;3(6):327–3) para inferir secuencias de aminoácidos de las listas de picos realizando búsquedas contra una base de datos de secuencias que consiste en Ensembl
10 (<http://www.ensembl.org/index.html>), IPI (www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html) y SwissProt (<http://www.uniprot.org>) junto con secuencias proteicas contaminantes. Los criterios para la identificación de péptidos incluyeron digestión con tripsina, hasta 2 sitios de disociación faltantes y diversas modificaciones biológicas y químicas (metionina oxidada, modificación de cisteína por MMTS o
15 yodoacetamida y fosforilación de serina, treonina y tirosina). Los péptidos clasificados 1 con un valor de expectativa de 0,05% o menos, un puntaje de iones de 28 o superior se cargaron en la base de datos OGAP.

1.4 *Discriminación de péptidos asociados a LY75*

El proceso para identificar LY75 utilizó las secuencias de péptidos obtenidas
20 experimentalmente por espectrometría de masas, según lo descrito con anterioridad, de proteínas humanas de presentación natural para identificar y organizar exones codificantes en la secuencia del genoma humano publicada. Estas secuencias determinadas experimentalmente fueron comparadas con la base de datos OGAP® la cual fue compilada mediante el procesamiento e
25 integración de masas de péptidos, signatures de péptidos, ESTs y Datos de Secuencias Genómicas de Dominio Público (“Public Domain Genomic Sequence Data”) según lo descrito en la Solicitud de Patente Internacional WO2009/087462.

Resultados

Los resultados del ensayo de interacción y precipitación (“pull down”) de péptidos usando el anticuerpo LY75_A1 se muestran en la Tabla 1 que aparece a continuación y en la Figura 7. Los péptidos que fueron identificados en ambas eluciones peptídicas 1a y 1b en el ensayo de interacción y precipitación (“pull down”) y en el ensayo de microarreglos fueron considerados como los candidatos más probables para formar el epítipo.

Tabla 1 Comparación de microarreglo de péptidos y experimentos de interacción y precipitación (pull down) de péptidos

SEQ ID NO:	Péptido Identificado por Ensayo de Microarreglos	Péptido Identificado por Ensayo de Interacción y Precipitación (“Pull Down”)
	Región 1 (aa609–618)	–
	Región 2 (aa651–662)	–
46	Región 3 (aa761–780)	GWHFYDDR (765–772)
47 48	Región 4 (aa883–901)	ISEWPIDDHFTYSR(877 to 890) FPVTFGEECLYMSAK(896–910)
49	Región 5 (aa1029–1040)	ELTYSNFHPLLVSGR(1030–1044)
50	Región 6 (aa1077–1093)	HFVSLCQK (1084–1091)
51	Región 7 (aa1107–1118)	QTLQNASET VK (1099–1109)
	Región 8 (aa1368–1378)	–
	Región 9 (aa1518–1528)	–
	Región 10 (aa1535–1554)	–

La Tabla 1 muestra que se identificaron una cantidad de regiones de péptidos LY75 superpuestas tanto en el ensayo de Microarreglos de Péptidos como en ambas eluciones 1a y 1b del ensayo de interacción y precipitación (“pull down”) de péptidos. Se considera que estas regiones son las que tienen mayores

probabilidades de contener el epítipo reconocido por el anticuerpo LY75_A1 ya que están unidas por LY75_A1 ensayado por ambas técnicas empleadas.

Ejemplo 26

- 5 Se expuso una cantidad de células B activadas de líneas celulares de linfoma difuso de células B grandes (ABC-DLBCL) (es decir, líneas celulares TMD8 y HBL1) durante 72 horas a dosis crecientes de LY75_DM4 (es decir, 0,018 – 0,037 – 0,075 – 0,15 – 0,3 – 0,6 – 1,2 nM) tanto solas como en combinación con dosis crecientes de Rituximab (2,34 – 4,68 – 9,37 – 18,75 – 37,5 – 75 – 150) o Ibrutinib
10 (15,6 – 31,2 – 62,5 – 125 – 250 – 500 – 1000 nM). Esto fue seguido de un ensayo MTT [3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil tetrazolio bromuro].

El índice de combinación (CI) Chou-Talalay se estimó usando el paquete Synergy R (*Preclinical versus Clinical Drugs Combination Studies*. Chou TC. *Leuk. Lymphoma*. 2008;49(11):2059-2080). Esto proporciona una definición cuantitativa
15 de sinergia fuerte (<0,3), sinergia (0,3-0,9), efecto aditivo (0,9-1,1) o antagonismo/sin beneficios (> 1,1).

Las Figuras 8A-B muestran los efectos sinérgicos observados entre LY75_DM4 y Rituximab. La Figura 9 muestra los efectos sinérgicos observados entre LY75_DM4 y Ibrutinib. La información de respaldo se muestra en las Tablas 2, 3,
20 y 4 a continuación.

Tabla 2: Índice de combinación (CI) Chou-Talalay de diferentes dosis de LY75_DM4 en combinación con Rituximab en tres líneas celulares TMD8 ABC-DLBCL.

25

Nº	Rituximab (nM)	LY75_DM4 (nM)	CI
1	2,3438	0,01875	17,124
2	2,3438	0,075	0,225
3	2,3438	0,15	0,346

4	2,3438	0,3	0,583
5	2,3438	0,6	1,165
6	2,3438	1,2	2,514
7	2,3438	0,0375	0,145
8	4,6875	0,01875	1,499
9	4,6875	0,0375	0,147
10	4,6875	0,075	0,216
11	4,6875	0,15	0,346
12	4,6875	0,3	0,628
13	4,6875	0,6	1,165
14	4,6875	1,2	2,514
15	9,375	0,01875	2,918
16	9,375	0,0375	0,144
17	9,375	0,075	0,219
18	9,375	0,15	0,332
19	9,375	0,3	0,583
20	9,375	0,6	1,025
21	9,375	1,2	2,514
22	18,75	0,01875	0,8
23	18,75	0,0375	0,145
24	18,75	0,075	0,213
25	18,75	0,15	0,346
26	18,75	0,3	0,628
27	18,75	0,6	1,165
28	18,75	1,2	2,514
29	37,5	0,01875	11,427
30	37,5	0,075	0,216
31	37,5	0,15	0,332
32	37,5	0,3	0,583
33	37,5	0,6	1,165
34	37,5	1,2	2,655
35	37,5	0,0375	0,151
36	75	0,01875	0,216
37	75	0,0375	0,147
38	75	0,075	0,209
39	75	0,15	0,332
40	75	0,3	0,628
41	75	0,6	1,165
42	75	1,2	2,514
43	150	0,01875	45,466
44	150	0,0375	0,152
45	150	0,075	0,209

46	150	0,15	0,332
47	150	0,3	0,628
48	150	0,6	1,257
49	150	1,2	2,770

Tabla 3: Índice de combinación (CI) Chou-Talalayde diferentes dosis de LY75_DM4 en combinación con Rituximab en tres líneas celulares HBL-1 ABC-DLBCL

5

Nº	Rituximab (nM)	LY75_DM4 (nM)	CI
1	2,3438	0,0188	0,534
2	2,3438	0,0750	0,958
3	2,3438	0,1500	0,603
4	2,3438	0,3000	0,509
5	2,3438	0,6000	0,454
6	2,3438	1,2000	0,817
7	2,3438	0,0375	0,413
8	4,6875	0,0188	0,568
9	4,6875	0,0375	0,837
10	4,6875	0,0750	0,919
11	4,6875	0,1500	0,635
12	4,6875	0,3000	0,580
13	4,6875	0,6000	0,501
14	4,6875	1,2000	0,908
15	9,375	0,0188	0,249
16	9,375	0,0375	1,576
17	9,375	0,0750	0,717
18	9,375	0,1500	0,439

19	9,375	0,3000	0,618
20	9,375	0,6000	0,501
21	9,375	1,2000	0,908
22	18,75	0,0188	0,787
23	18,75	0,0375	0,497
24	18,75	0,0750	0,562
25	18,75	0,1500	0,545
26	18,75	0,3000	0,510
27	18,75	0,6000	0,366
28	18,75	1,2000	0,817
29	37,50	0,0375	0,734
30	37,50	0,0750	0,548
31	37,50	0,0188	0,543
32	37,50	0,1500	0,465
33	37,50	0,3000	0,476
34	37,50	0,6000	0,324
35	37,50	1,2000	0,648
36	75	0,0188	0,442
37	75	0,0375	1,578
38	75	0,0750	0,432
39	75	0,1500	0,493
40	75	0,3000	0,383
41	75	0,6000	0,409
42	75	1,2000	0,908
43	150	0,0188	0,680
44	150	0,0375	0,640

45	150	0,0750	0,911
46	150	0,1500	0,498
47	150	0,3000	0,355
48	150	0,6000	0,366
49	150	1,2000	0,817

Tabla 4: Índice de combinación (CI) Chou-Talalayde diferentes dosis de LY75_DM4 en combinación con Ibrutinib en tres líneas celulares HBL-1 ABC-DLBCL

5

N°	Ibrutinib (nM)	LY75_DM4 (nM)	CI
1	1,5625	0,01875	0,481
2	1,5625	0,0375	0,627
3	1,5625	0,075	0,862
4	1,5625	0,15	0,360
5	1,5625	0,3	0,287
6	1,5625	0,6	0,270
7	1,5625	1,2	0,343
8	3,125	0,01875	0,411
9	3,125	0,0375	0,358
10	3,125	0,075	0,461
11	3,125	0,15	0,287
12	3,125	0,3	0,251
13	3,125	0,6	0,246
14	3,125	1,2	0,394
15	6,25	0,01875	0,204
16	6,25	0,0375	0,219

17	6,25	0,075	0,275
18	6,25	0,15	0,226
19	6,25	0,3	0,216
20	6,25	0,6	0,222
21	6,25	1,2	0,343
22	12,5	0,01875	0,205
23	12,5	0,0375	0,152
24	12,5	0,075	0,287
25	12,5	0,15	0,217
26	12,5	0,3	0,228
27	12,5	0,6	0,222
28	12,5	1,2	0,343
29	25	0,01875	0,152
30	25	0,0375	0,183
31	25	0,075	0,202
32	25	0,15	0,199
33	25	0,3	0,193
34	25	0,6	0,222
35	25	1,2	0,343
36	50	0,01875	0,374
37	50	0,0375	0,473
38	50	0,075	0,287
39	50	0,15	0,192
40	50	0,3	0,194
41	50	0,6	0,246
42	50	1,2	0,394

43	100	0,01875	0,715
44	100	0,0375	0,748
45	100	0,075	0,457
46	100	0,15	0,187
47	100	0,3	0,195
48	100	0,6	0,222
49	100	1,2	0,394

SECUENCIAS:

SEQ ID No	Descripción	Secuencia
1	A1_VH aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPG KGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVQGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTIFGVVSFDYWGGQGLTVTVSS
2	A1_VL aa	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDYLSWYQQRPGKAP NLLIYAASNLKTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYCQ QSYRSPWTFGQGTKVEIKR
3	A1_VH nt	gaggtgcagctggtggagctctgggggaggcttgtaaagccgggggggtcccttagactct cctgtgcagcctctggcttcacttacagtaacgcctggatgagctgggtccgccaggctcca gggaaggggctggagtggttgccgtattaaaagcaaaactgatgggtgggacaacaga ctacgctgcacccgtgcaaggcagattcaccatctcaagagatgattcaaaaaacacgctg tatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacagccgtgtattactgtacgattttgga gtggttagcttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctca
4	A1_VL nt	gacgtccagatgaccagctctccatcctcctgtctgcatctgttgagacagagtcaccatc acttgccgggcaagtcagagcattagcgactatttaagttggtatcagcagagaccaggga aagcccctaacctctgatctatgtgcatccaatttaaagactgggtcccatcaaggttca gtggcagtggtctgggacagatttcactctcaccatcagcactctgcaacctgaagatttg caacgtactactgtcaacagagttacaggtccccgtggacgttcggccaagggaaccaagg tggaatcaaacga
5	A1_VH_CDR 1 aa	NAWMS
6	A1_VH_CDR 2 aa	RIKSKTDGGTTDYAAPVQG
7	A1_VH_CDR 3 aa	FGVVSFDY
8	A1_VL_CDR1 aa	RASQSIDYLS
9	A1_VL_CDR2 aa	AASNLKT
10	A1_VL_CDR3 aa	QSYRSPWT
11	VH3 3- 15/D4 411	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPG KGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTTTT

12	JH4	YFDYWGGGTLTVSS
13	O12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYS
14	JK1	WTFGQGTKVEIKR
15	LY75 (DEC-205)	MRTGWATPRRPAGLLMLLFWFFDLAEPSGRAANDPFTIVHGNT GKCIKPVYGWIVADDCDEDEDKLWKWVSQHRLFHLHSQKCLGL DITKSVNELRMFSCDSSAMLWWKCEHHSYGAARYRLALKDGH GTAISNASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTRDGN SYGRPCEFPF LIDGTWHHDCILDEDHSGPWCAATLNYEYDRKWGICLK PENGCE DNWEKNEQFGSCYQFNTQTALSWKEAYVSCQNQGADLLSINSA AELTYLKEKEGIAKIFWIGLNQLYSARGWEWS DHKPLNFLNWD P DRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFSCEAQLPYVCRKPLNNT VELTDVWTYS DTRCDAGWLPNNGFCYLLVNESNSWDKAHAKCK AFSSDLISIHSLADVEVVTKLHNEDIKEEVWIGLKNINIPTLFQWS DGTEVTLTYWDENEPNVPYNKTPNCVSYLGELGQWKVQSCEEK LKYVCKRKGEKLN DASSDKMCPPEDEGWKRHGETCYKIYEDEV P FGTNCNLTITSRFEQEYLNDLMKKYDKSLRK YFWTGLRDVDSCG EYNWATVGRRRAVTF SNWNFLEPASPGGC VAMSTGKSVGKW EVKDCRSFKALSICKKMSGPLGP EEASPKPDDPCPEGWQS FPA SLSCYKVFHAERIVRKRNWEEAERFCQALGAHLSSFSHVDEIKEF LHFLTDQFSGQH WLWIGLNKRSPDLQGSWQWSDRTPVSTIIMP NEFQQDYDIRDCAAVKVFHRPWRRGW HFYDDREFIYLRPFACD TKLEWVCQIPKGRTPKTPDWYNPDRA GIHG PPLIIEGSEYWFVAD LHLNYEEAVLYCASNHSFLATITSFVGLKAIKNKIANISGDGQKWW IRISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFGEECLYMSAKTWLIDLGKP TDCSTKL PFICEKYNVSSLEKYS PD SAAKVQCSEQWIPFQNK CFL KIKPVSLTFSQASDTCHSYGGTLPSVLSQIEQDFITSLLPDMEATL WIGLRWTAYEKINKWTDNRELTYSNFHPLLVS GRLRIPENFFEEE SRYHCALILNLQKSPFTGTWNFTSCSERHFVSLCQKYSEVKS RQ TLQNASETVKYLN NLYKIIPKLTWHS AKRECLKSNMQLVSITDPY QQAFLSVQALLHNSSLWIGLFSQDDELNFGWSDGKRLHFSRWA ETNGQLEDCVVLDTDGFWKT VDCNDNQP GAICYYS GNETEKEV KPVDSVKCPSPVLNTPWIPFQNC CYNFIITKNRHMATTQDEVHTK CQKLNPKSHILSIRDEKENNFVLEQLLYFN YMASWVMLGITYRNK SLMWFDKTPLSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDGFWDIQTFKVI

		EEAVYFHQHSILACKIEMVDYKEEYNTTLPQFMPYEDGIYSVIQKK VTWYEALNMCSSQSGGHLASVHNQNGQLFLEDIVKRDGFPLWVG LSSHGDGSESSFWDGSTFDYIPWKGQTSPGNCVLLDPKGTWK HEKCNSVKDGAICYKPTKSKKLSRLTYSSRCPAAKENGSRWIQY KGHCYKSDQALHSFSEAKKLCSKHDHSATIVSIKDEDEDENKFVSRL MRENNNITMRVWLGLSQHSVDQSWSWLDGSEVTFVKWENKSK SGVGRCSMLIASNETWKKVECEHGFGFGRVVKVPLGPDYTAIAIIV ATLSILVLMGGLIWFLFQRHRLHLAGFSSVRYAQGVNEDEIMLPS FHD
16	A1_VH_FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYS
17	A1_VH_FR2	WVRQAPGKGLEWVG
18	A1_VH_FR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTI
19	A1_VH_FR4	WGQGTLVTVSS
20	A1_VL_FR1	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
21	A1_VL_FR2	WYQQRPGKAPNLLIY
22	A1_VL_FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYC
23	A1_VL_FR4	FGQGTKVEIKR
24	LY75 609-618	WEVKDCRSFK
25	LY75 651-662	PASLSCYKVFHA
26	LY75 761-780	PWRRGWHFYDDREFIYLRPF
27	LY75 883-901	DDHFTYSRYPWHRFPVTFG
28	LY75 1029-1040	RELTYSNFHPLL
29	LY75 1077-1093	FTSCSERHFVSLCQKYS
30	LY75 1107-1118	TVKYLNNLYKII
31	LY75 1368-1378	EAVYFHQHSIL
32	LY75 1518-1528	KKLSRLTYSSC
33	LY75 1535-1554	NGSRWIQYKGHCYKSDQALH
34	LY75 877-901	ISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFG
35	LY75 1099-1118	QTLQNASETVKYLNNLYKII

36	LY75 883-892	DDHFTYSRYP
37	LY75 1077-1091	FTSCSERHFVSLCQK
38	Rituximab VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRG LEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDS AVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
39	Rituximab VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKP WIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ WTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
40	Rituximab VH_CDR1	SYNMH
41	Rituximab VH_CDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG
42	Rituximab VH_CDR3	STYYGGDWYFNV
43	Rituximab VL_CDR1	RASSSVSYIH
44	Rituximab VL_CDR2	ATSNLAS
45	Rituximab VL_CDR3	QQWTSNPPTF
46	(765-772)	GWHFYDDR
47	(877 a 890)	ISEWPIDDHFTYSR
48	(896-910)	FPVTFGEECLYMSAK
49	(1030-1044)	ELTYSNFHPLLVSGR
50	(1084-1091)	HFVSLCQK
51	(1099-1109)	QTLQNASETvk

52	Ligante	Gly-Phe-Leu-Gly
----	---------	-----------------

Texto libre de la lista de secuencias:

- SEQ ID NO: 38 <223> secuencia VH Rituximab
SEQ ID NO: 39 <223> secuencia VL Rituximab
5 SEQ ID NO: 40 <223> VH_CDR1 Rituximab
SEQ ID NO: 41 <223> VH_CDR2 Rituximab
SEQ ID NO: 42 <223> VH_CDR3 Rituximab
SEQ ID NO: 43 <223> VL_CDR1 Rituximab
SEQ ID NO: 44 <223> VL_CDR2 Rituximab
10 SEQ ID NO: 45 <223> VL_CDR3 Rituximab
SEQ ID NO: 52 <223> Ligante
SEQ ID NOs: 53-163 <223> Péptido
SEQ ID NOs: 165-207 <223> Péptido

Listado de secuencias

<110> Berlin-Chemie AG
 5 <120> Combinaciones farmacéuticas
 <130> 489.131183/01
 10 <160> 207
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 119
 15 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 1
 20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Ser Asn Ala
 20 25 30
 30 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 35 Pro Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 40 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 45 Tyr Cys Thr Ile Phe Gly Val Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 50 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 108
 55 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 2
 60 Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 65 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 70 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 75 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 80 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Ser Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 3
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Humano

 10 <400> 3
 gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtaaagc cggggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtgcag cctctggctt cacttacagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180
 15 gactacgtg caccctgtga aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtacgatt 300
 20 tttggagtgg ttagctttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

 25 <210> 4
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Humano

 30 <400> 4
 gacgtccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc gactatttaa gttggtatca gcagagacca 120
 gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccaatt taaagactgg ggtcccatca 180
 35 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcac tctgcaacct 240
 gaagattttg caacgtacta ctgtcaacag agttacaggt ccccgtaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acga 324

 40 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Humano
 45 <400> 5
 Asn Ala Trp Met Ser
 50 1 5

 55 <210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 6
 60 Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 val Gln Gly
 65
 70 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 7
 75 Phe Gly Val Val Ser Phe Asp Tyr
 1 5

 80 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 8

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Ser
 1 5 10
 5
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Humano
 10
 <400> 9
 Ala Ala Ser Asn Leu Lys Thr
 1 5
 15
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Humano
 20
 <400> 10
 Gln Gln Ser Tyr Arg Ser Pro Trp Thr
 1 5
 25
 <210> 11
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Humano
 30
 <400> 11
 35 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 45 Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 50 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 55 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 60 Tyr Cys Thr Thr Thr Thr Val Thr
 100
 65
 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 12
 70 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15
 75
 <210> 13
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 13
 80 Asp 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 Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 5 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 10 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 20 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser
 85 90
 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> Humano
 <400> 14
 30 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 1722
 <212> PRT
 35 <213> Humano
 <400> 15
 40 Met Arg Thr Gly Trp Ala Thr Pro Arg Arg Pro Ala Gly Leu Leu Met
 1 5 10 15
 45 Leu Leu Phe Trp Phe Phe Asp Leu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ala Ala
 20 25 30
 50 Asn Asp Pro Phe Thr Ile Val His Gly Asn Thr Gly Lys Cys Ile Lys
 35 40 45
 Pro Val Tyr Gly Trp Ile Val Ala Asp Asp Cys Asp Glu Thr Glu Asp
 50 55 60
 55 Lys Leu Trp Lys Trp Val Ser Gln His Arg Leu Phe His Leu His Ser
 65 70 75 80
 60 Gln Lys Cys Leu Gly Leu Asp Ile Thr Lys Ser Val Asn Glu Leu Arg
 85 90 95
 65 Met Phe Ser Cys Asp Ser Ser Ala Met Leu Trp Trp Lys Cys Glu His
 100 105 110
 70 His Ser Leu Tyr Gly Ala Ala Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Asp Gly
 115 120 125
 His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys Lys Gly Gly
 130 135 140
 75 Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr Thr Arg
 145 150 155 160
 80 Asp Gly Asn Ser Tyr Gly Arg Pro Cys Glu Phe Pro Phe Leu Ile Asp
 165 170 175

Gly Thr Trp His His Asp Cys Ile Leu Asp Glu Asp His Ser Gly Pro
 180 185 190
 5 Trp Cys Ala Thr Thr Leu Asn Tyr Glu Tyr Asp Arg Lys Trp Gly Ile
 195 200 205
 10 Cys Leu Lys Pro Glu Asn Gly Cys Glu Asp Asn Trp Glu Lys Asn Glu
 210 215 220
 15 Gln Phe Gly Ser Cys Tyr Gln Phe Asn Thr Gln Thr Ala Leu Ser Trp
 225 230 235 240
 Lys Glu Ala Tyr Val Ser Cys Gln Asn Gln Gly Ala Asp Leu Leu Ser
 245 250 255
 20 Ile Asn Ser Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Lys Glu Lys Glu Gly Ile
 260 265 270
 25 Ala Lys Ile Phe Trp Ile Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ser Ala Arg Gly
 275 280 285
 30 Trp Glu Trp Ser Asp His Lys Pro Leu Asn Phe Leu Asn Trp Asp Pro
 290 295 300
 35 Asp Arg Pro Ser Ala Pro Thr Ile Gly Gly Ser Ser Cys Ala Arg Met
 305 310 315 320
 Asp Ala Glu Ser Gly Leu Trp Gln Ser Phe Ser Cys Glu Ala Gln Leu
 325 330 335
 40 Pro Tyr Val Cys Arg Lys Pro Leu Asn Asn Thr Val Glu Leu Thr Asp
 340 345 350
 45 Val Trp Thr Tyr Ser Asp Thr Arg Cys Asp Ala Gly Trp Leu Pro Asn
 355 360 365
 50 Asn Gly Phe Cys Tyr Leu Leu Val Asn Glu Ser Asn Ser Trp Asp Lys
 370 375 380
 55 Ala His Ala Lys Cys Lys Ala Phe Ser Ser Asp Leu Ile Ser Ile His
 385 390 395 400
 Ser Leu Ala Asp Val Glu Val Val Val Thr Lys Leu His Asn Glu Asp
 405 410 415
 60 Ile Lys Glu Glu Val Trp Ile Gly Leu Lys Asn Ile Asn Ile Pro Thr
 420 425 430
 65 Leu Phe Gln Trp Ser Asp Gly Thr Glu Val Thr Leu Thr Tyr Trp Asp
 435 440 445
 70 Glu Asn Glu Pro Asn Val Pro Tyr Asn Lys Thr Pro Asn Cys Val Ser
 450 455 460
 75 Tyr Leu Gly Glu Leu Gly Gln Trp Lys Val Gln Ser Cys Glu Glu Lys
 465 470 475 480
 Leu Lys Tyr Val Cys Lys Arg Lys Gly Glu Lys Leu Asn Asp Ala Ser
 485 490 495
 80 Ser Asp Lys Met Cys Pro Pro Asp Glu Gly Trp Lys Arg His Gly Glu
 500 505 510

Thr Cys Tyr₅₁₅ Lys Ile Tyr Glu Asp₅₂₀ Glu Val Pro Phe Gly₅₂₅ Thr Asn Cys
 5 Asn Leu₅₃₀ Thr Ile Thr Ser Arg₅₃₅ Phe Glu Gln Glu Tyr₅₄₀ Leu Asn Asp Leu
 10 Met₅₄₅ Lys Lys Tyr Asp Lys₅₅₀ Ser Leu Arg Lys Tyr₅₅₅ Phe Trp Thr Gly Leu₅₆₀
 15 Arg Asp Val Asp Ser₅₆₅ Cys Gly Glu Tyr Asn₅₇₀ Trp Ala Thr Val Gly₅₇₅ Gly
 20 Arg Arg Arg Ala₅₈₀ Val Thr Phe Ser Asn₅₈₅ Trp Asn Phe Leu Glu₅₉₀ Pro Ala
 Ser Pro Gly₅₉₅ Gly Cys Val Ala Met₆₀₀ Ser Thr Gly Lys Ser₆₀₅ Val Gly Lys
 25 Trp Glu₆₁₀ Val Lys Asp Cys Arg₆₁₅ Ser Phe Lys Ala Leu₆₂₀ Ser Ile Cys Lys
 30 Lys₆₂₅ Met Ser Gly Pro Leu₆₃₀ Gly Pro Glu Glu Ala₆₃₅ Ser Pro Lys Pro Asp₆₄₀
 35 Asp Pro Cys Pro Glu₆₄₅ Gly Trp Gln Ser Phe₆₅₀ Pro Ala Ser Leu Ser₆₅₅ Cys
 40 Tyr Lys Val Phe₆₆₀ His Ala Glu Arg Ile₆₆₅ Val Arg Lys Arg Asn₆₇₀ Trp Glu
 Glu Ala Glu₆₇₅ Arg Phe Cys Gln Ala₆₈₀ Leu Gly Ala His Leu₆₈₅ Ser Ser Phe
 45 Ser His₆₉₀ Val Asp Glu Ile Lys₆₉₅ Glu Phe Leu His Phe₇₀₀ Leu Thr Asp Gln
 50 Phe₇₀₅ Ser Gly Gln His Trp₇₁₀ Leu Trp Ile Gly Leu₇₁₅ Asn Lys Arg Ser Pro₇₂₀
 55 Asp Leu Gln Gly Ser₇₂₅ Trp Gln Trp Ser Asp₇₃₀ Arg Thr Pro Val Ser₇₃₅ Thr
 60 Ile Ile Met Pro₇₄₀ Asn Glu Phe Gln Gln₇₄₅ Asp Tyr Asp Ile Arg₇₅₀ Asp Cys
 Ala Ala Val₇₅₅ Lys Val Phe His Arg₇₆₀ Pro Trp Arg Arg Gly₇₆₅ Trp His Phe
 65 Tyr Asp₇₇₀ Asp Arg Glu Phe Ile₇₇₅ Tyr Leu Arg Pro Phe₇₈₀ Ala Cys Asp Thr
 70 Lys₇₈₅ Leu Glu Trp Val Cys₇₉₀ Gln Ile Pro Lys Gly₇₉₅ Arg Thr Pro Lys Thr₈₀₀
 75 Pro Asp Trp Tyr Asn₈₀₅ Pro Asp Arg Ala Gly₈₁₀ Ile His Gly Pro Pro₈₁₅ Leu
 80 Ile Ile Glu Gly₈₂₀ Ser Glu Tyr Trp Phe₈₂₅ Val Ala Asp Leu His₈₃₀ Leu Asn
 Tyr Glu Glu₈₃₅ Ala Val Leu Tyr Cys₈₄₀ Ala Ser Asn His Ser₈₄₅ Phe Leu Ala

5 Thr Ile Thr Ser Phe Val Gly Leu Lys Ala Ile Lys Asn Lys Ile Ala
 850 855 860
 Asn Ile Ser Gly Asp Gly Gln Lys Trp Trp Ile Arg Ile Ser Glu Trp
 865 870 875 880
 10 Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe
 885 890 895
 15 Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys Thr Trp
 900 905 910
 20 Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys Leu Pro Phe
 915 920 925
 25 Ile Cys Glu Lys Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Lys Tyr Ser Pro Asp
 930 935 940
 Ser Ala Ala Lys Val Gln Cys Ser Glu Gln Trp Ile Pro Phe Gln Asn
 945 950 955 960
 30 Lys Cys Phe Leu Lys Ile Lys Pro Val Ser Leu Thr Phe Ser Gln Ala
 965 970 975
 35 Ser Asp Thr Cys His Ser Tyr Gly Gly Thr Leu Pro Ser Val Leu Ser
 980 985 990
 40 Gln Ile Glu Gln Asp Phe Ile Thr Ser Leu Leu Pro Asp Met Glu Ala
 995 1000 1005
 45 Thr Leu Trp Ile Gly Leu Arg Trp Thr Ala Tyr Glu Lys Ile Asn
 1010 1015 1020
 Lys Trp Thr Asp Asn Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro
 1025 1030 1035
 50 Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu
 1040 1045 1050
 55 Glu Glu Ser Arg Tyr His Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys
 1055 1060 1065
 60 Ser Pro Phe Thr Gly Thr Trp Asn Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg
 1070 1075 1080
 65 His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys Ser Arg
 1085 1090 1095
 Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn
 1100 1105 1110
 70 Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys
 1115 1120 1125
 75 Arg Glu Cys Leu Lys Ser Asn Met Gln Leu Val Ser Ile Thr Asp
 1130 1135 1140
 80 Pro Tyr Gln Gln Ala Phe Leu Ser Val Gln Ala Leu Leu His Asn
 1145 1150 1155
 Ser Ser Leu Trp Ile Gly Leu Phe Ser Gln Asp Asp Glu Leu Asn
 1160 1165 1170

5 Phe Gly Trp Ser Asp Gly Lys Arg Leu His Phe Ser Arg Trp Ala
 1175 1180 1185
 10 Glu Thr Asn Gly Gln Leu Glu Asp Cys Val Val Leu Asp Thr Asp
 1190 1200
 15 Gly Phe Trp Lys Thr Val Asp Cys Asn Asp Asn Gln Pro Gly Ala
 1205 1210 1215
 20 Ile Cys Tyr Tyr Ser Gly Asn Glu Thr Glu Lys Glu Val Lys Pro
 1220 1225 1230
 25 Val Asp Ser Val Lys Cys Pro Ser Pro Val Leu Asn Thr Pro Trp
 1235 1240 1245
 30 Ile Pro Phe Gln Asn Cys Cys Tyr Asn Phe Ile Ile Thr Lys Asn
 1250 1255 1260
 35 Arg His Met Ala Thr Thr Gln Asp Glu Val His Thr Lys Cys Gln
 1265 1270 1275
 40 Lys Leu Asn Pro Lys Ser His Ile Leu Ser Ile Arg Asp Glu Lys
 1280 1285 1290
 45 Glu Asn Asn Phe Val Leu Glu Gln Leu Leu Tyr Phe Asn Tyr Met
 1295 1300 1305
 50 Ala Ser Trp Val Met Leu Gly Ile Thr Tyr Arg Asn Lys Ser Leu
 1310 1315 1320
 55 Met Trp Phe Asp Lys Thr Pro Leu Ser Tyr Thr His Trp Arg Ala
 1325 1330 1335
 60 Gly Arg Pro Thr Ile Lys Asn Glu Lys Phe Leu Ala Gly Leu Ser
 1340 1345 1350
 65 Thr Asp Gly Phe Trp Asp Ile Gln Thr Phe Lys Val Ile Glu Glu
 1355 1360 1365
 70 Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu Ala Cys Lys Ile Glu
 1370 1375 1380
 75 Met Val Asp Tyr Lys Glu Glu Tyr Asn Thr Thr Leu Pro Gln Phe
 1385 1390 1395
 80 Met Pro Tyr Glu Asp Gly Ile Tyr Ser Val Ile Gln Lys Lys Val
 1400 1405 1410
 Thr Trp Tyr Glu Ala Leu Asn Met Cys Ser Gln Ser Gly Gly His
 1415 1420 1425
 85 Leu Ala Ser Val His Asn Gln Asn Gly Gln Leu Phe Leu Glu Asp
 1430 1435 1440
 90 Ile Val Lys Arg Asp Gly Phe Pro Leu Trp Val Gly Leu Ser Ser
 1445 1450 1455
 95 His Asp Gly Ser Glu Ser Ser Phe Glu Trp Ser Asp Gly Ser Thr
 1460 1465 1470
 Phe Asp Tyr Ile Pro Trp Lys Gly Gln Thr Ser Pro Gly Asn Cys
 1475 1480 1485

5 Val Leu 1490 Leu Asp Pro Lys Gly 1495 Thr Trp Lys His Glu 1500 Lys Cys Asn
 Ser Val 1505 Lys Asp Gly Ala Ile 1510 Cys Tyr Lys Pro Thr 1515 Lys Ser Lys
 10 Lys Leu 1520 Ser Arg Leu Thr Tyr 1525 Ser Ser Arg Cys Pro 1530 Ala Ala Lys
 15 Glu Asn 1535 Gly Ser Arg Trp Ile 1540 Gln Tyr Lys Gly His 1545 Cys Tyr Lys
 20 Ser Asp 1550 Gln Ala Leu His Ser 1555 Phe Ser Glu Ala Lys 1560 Lys Leu Cys
 25 Ser Lys 1565 His Asp His Ser Ala 1570 Thr Ile Val Ser Ile 1575 Lys Asp Glu
 Asp Glu 1580 Asn Lys Phe Val Ser 1585 Arg Leu Met Arg Glu 1590 Asn Asn Asn
 30 Ile Thr 1595 Met Arg Val Trp Leu 1600 Gly Leu Ser Gln His 1605 Ser Val Asp
 35 Gln Ser 1610 Trp Ser Trp Leu Asp 1615 Gly Ser Glu Val Thr 1620 Phe Val Lys
 40 Trp Glu 1625 Asn Lys Ser Lys Ser 1630 Gly Val Gly Arg Cys 1635 Ser Met Leu
 45 Ile Ala 1640 Ser Asn Glu Thr Trp 1645 Lys Lys Val Glu Cys 1650 Glu His Gly
 Phe Gly 1655 Arg Val Val Cys Lys 1660 Val Pro Leu Gly Pro 1665 Asp Tyr Thr
 50 Ala Ile 1670 Ala Ile Ile Val Ala 1675 Thr Leu Ser Ile Leu 1680 Val Leu Met
 55 Gly Gly 1685 Leu Ile Trp Phe Leu 1690 Phe Gln Arg His Arg 1695 Leu His Leu
 60 Ala Gly 1700 Phe Ser Ser Val Arg 1705 Tyr Ala Gln Gly Val 1710 Asn Glu Asp
 65 Glu Ile 1715 Met Leu Pro Ser Phe 1720 His Asp
 70 <210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 16
 75 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 80 Ser Leu Arg 20 Leu Ser Cys Ala Ala Ser 25 Gly Phe Thr Tyr Ser 30
 <210> 17
 <211> 14

<212> PRT
 <213> Humano
 5 <400> 17
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10
 10 <210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Humano
 15 <400> 18
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 20 Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 20 25 30
 25 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Humano
 30 <400> 19
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 35 <210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Humano
 40 <400> 20
 Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20
 50 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Humano
 55 <400> 21
 Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 60 <210> 22
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Humano
 65 <400> 22
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 70 Leu Thr Ile Ser Thr Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 75 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Humano
 80 <400> 23

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

5 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Humano

10 <400> 24
 Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys
 1 5 10

15 <210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Humano

20 <400> 25
 Pro Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe His Ala
 1 5 10

25 <210> 26
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Humano

30 <400> 26
 Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr
 1 5 10 15

35 Leu Arg Pro Phe
 20

40 <210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Humano

45 <400> 27
 Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro Val
 1 5 10 15

50 Thr Phe Gly

55 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Humano

60 <400> 28
 Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu
 1 5 10

65 <210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Humano

70 <400> 29
 Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr
 1 5 10 15

75 Ser

80 <210> 30

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Humano
 5 <400> 30
 Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile
 1 5 10
 10
 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Humano
 15 <400> 31
 Glu Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu
 1 5 10
 20
 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Humano
 25 <400> 32
 Lys Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Cys
 1 5 10
 30
 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 33
 40 Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp
 1 5 10 15
 45 Gln Ala Leu His
 20
 50
 <210> 34
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 34
 55 Ile Ser Glu Trp Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro
 1 5 10 15
 60 Trp His Arg Phe Pro Val Thr Phe Gly
 20 25
 65
 <210> 35
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 35
 70 Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu
 1 5 10 15
 75 Tyr Lys Ile Ile
 20
 80
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 36

Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro
 1 5 10
 5
 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Humano
 10
 <400> 37
 Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys
 1 5 10 15
 15
 <210> 38
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia VH Rituximab
 25
 <400> 38
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 30
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 35
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 40
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 45
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 50
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 55
 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110
 60
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 65
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 70
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 75
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 80
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

5 Gly Pro Ser Val Phe₂₄₅ Leu Phe Pro Pro Lys₂₅₀ Pro Lys Asp Thr Leu₂₅₅ Met
 Ile Ser Arg Thr₂₆₀ Pro Glu Val Thr Cys₂₆₅ Val Val Val Asp Val₂₇₀ Ser His
 10 Glu Asp Pro₂₇₅ Glu Val Lys Phe Asn₂₈₀ Trp Tyr Val Asp Gly₂₈₅ Val Glu Val
 15 His Asn₂₉₀ Ala Lys Thr Lys Pro₂₉₅ Arg Glu Glu Gln Tyr₃₀₀ Asn Ser Thr Tyr
 20 Arg Val Val Ser Val Leu₃₁₀ Thr Val Leu His Gln₃₁₅ Asp Trp Leu Asn Gly₃₂₀
 25 Lys Glu Tyr Lys Cys₃₂₅ Lys Val Ser Asn Lys₃₃₀ Ala Leu Pro Ala Pro₃₃₅ Ile
 Glu Lys Thr Ile₃₄₀ Ser Lys Ala Lys Gly₃₄₅ Gln Pro Arg Glu Pro₃₅₀ Gln Val
 30 Tyr Thr Leu₃₅₅ Pro Pro Ser Arg Asp₃₆₀ Glu Leu Thr Lys Asn₃₆₅ Gln Val Ser
 35 Leu Thr₃₇₀ Cys Leu Val Lys Gly₃₇₅ Phe Tyr Pro Ser Asp₃₈₀ Ile Ala Val Glu
 40 Trp Glu Ser Asn Gly Gln₃₉₀ Pro Glu Asn Asn Tyr₃₉₅ Lys Thr Thr Pro Pro₄₀₀
 45 Val Leu Asp Ser Asp₄₀₅ Gly Ser Phe Phe Leu₄₁₀ Tyr Ser Lys Leu Thr Val₄₁₅
 Asp Lys Ser Arg₄₂₀ Trp Gln Gln Gly Asn₄₂₅ Val Phe Ser Cys Ser₄₃₀ Val Met
 50 His Glu Ala₄₃₅ Leu His Asn His Tyr₄₄₀ Thr Gln Lys Ser Leu₄₄₅ Ser Leu Ser
 55 Pro Gly Lys₄₅₀
 60 <210> 39
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Secuencia VL Rituximab
 <400> 39
 70 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile₁₀ Leu Ser Ala Ser Pro Gly₁₅
 Glu Lys Val Thr₂₀ Met Thr Cys Arg Ala₂₅ Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 75 His Trp Phe₃₅ Gln Gln Lys Pro Gly₄₀ Ser Ser Pro Lys Pro₄₅ Trp Ile Tyr
 80 Ala Thr₅₀ Ser Asn Leu Ala Ser₅₅ Gly Val Pro Val Arg₆₀ Phe Ser Gly Ser

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 5 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 10 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 15 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 20 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 25 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 30 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 35 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 40 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH_CDR1 Rituximab
 50 <400> 40
 Ser Tyr Asn Met His
 1 5
 55 <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH_CDR2 Rituximab
 <400> 41
 65 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 70 Gly
 75 <210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 80 <220>
 <223> VH_CDR3 Rituximab
 <400> 42

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
 1 5 10

5 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> VL_CDR1 Rituximab
 <400> 43

15 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
 1 5 10

20 <210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> VL_CDR2 Rituximab
 <400> 44

30 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

35 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> VL_CDR3 Rituximab
 <400> 45

45 Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe
 1 5 10

50 <210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 46

55 Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg
 1 5

60 <210> 47
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 47

65 Ile Ser Glu Trp Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg
 1 5 10

70 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48

75 Phe Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys
 1 5 10 15

80 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 5 Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg
 1 5 10 15

 <210> 50
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 50
 15 His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys
 1 5

 <210> 51
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 51
 25 Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys
 1 5 10

 <210> 52
 <211> 4
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Ligante

 <400> 52
 40 Gly Phe Leu Gly
 1

 <210> 53
 <211> 8
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Péptido

 <400> 53
 55 Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser
 1 5

 <210> 54
 <211> 8
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Péptido

 <400> 54
 70 Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe
 1 5

 <210> 55
 <211> 8
 75 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 80 <223> Péptido

 <400> 55
 Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys
 1 5

	Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val
	1 5
5	<210> 62 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Péptido <400> 62
15	Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe
	1 5
20	<210> 63 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
25	<220> <223> Péptido <400> 63
30	Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe His
	1 5
35	<210> 64 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Péptido <400> 64
45	Ser Cys Tyr Lys Val Phe His Ala
	1 5
50	<210> 65 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Péptido
55	<400> 65
	Cys Tyr Lys Val Phe His Ala Glu
	1 5
60	<210> 66 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
65	<220> <223> Péptido <400> 66
70	Tyr Lys Val Phe His Ala Glu Arg
	1 5
75	<210> 67 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
80	<220> <223> Péptido <400> 67

Lys Val Phe His Ala Glu Arg Ile
 1 5
 5
 <210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 68
 15
 Val Phe His Ala Glu Arg Ile Val
 1 5
 20
 <210> 69
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 69
 30
 Phe His Ala Glu Arg Ile Val Arg
 1 5
 35
 <210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 70
 45
 Asp Cys Ala Ala Val Lys Val Phe
 1 5
 50
 <210> 71
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 71
 Ala Ala Val Lys Val Phe His Arg
 1 5
 60
 <210> 72
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 72
 Val Lys Val Phe His Arg Pro Trp
 1 5
 75
 <210> 73
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 80
 <220>
 <223> Péptido

<400> 73
 Val Phe His Arg Pro Trp Arg Arg
 1 5
 5
 <210> 74
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 15 <400> 74
 His Arg Pro Trp Arg Arg Gly Trp
 1 5
 20
 <210> 75
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 30 <400> 75
 Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe
 1 5
 35
 <210> 76
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 76
 45 Arg Arg Gly Trp His Phe Tyr Asp
 1 5
 50
 <210> 77
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 77
 60 Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg
 1 5
 65
 <210> 78
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 70
 <400> 78
 His Phe Tyr Asp Asp Arg Glu Phe
 1 5
 75
 <210> 79
 <211> 8
 <212> PRT
 80 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido

<400> 79
 5 Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr
 1 5

 10 <210> 80
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Péptido
 <400> 80
 Asp Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Arg
 1 5
 20

 25 <210> 81
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Péptido
 <400> 81
 Glu Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Phe
 1 5
 35

 40 <210> 82
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Péptido
 <400> 82
 Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr
 1 5
 50

 55 <210> 83
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Péptido
 <400> 83
 Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser
 1 5
 65

 70 <210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 75 <220>
 <223> Péptido
 <400> 84
 Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg
 1 5
 80

 <210> 85
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

	<223>	Péptido
	<400>	85
5	Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr	
	1	5
10	<210>	86
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
15	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	86
20	His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro	
	1	5
25	<210>	87
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
30	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	87
35	Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp	
	1	5
40	<210>	88
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
45	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	88
50	Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His	
	1	5
55	<210>	89
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
60	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	89
65	Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg	
	1	5
70	<210>	90
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
75	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	90
80	Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe	
	1	5
85	<210>	91
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido
 5 <400> 91
 Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro
 1 5

10 <210> 92
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido
 <400> 92

20 Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro Val
 1 5

25 <210> 93
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido
 <400> 93

35 Pro Trp His Arg Phe Pro Val Thr
 1 5

40 <210> 94
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido
 <400> 94

50 Trp His Arg Phe Pro Val Thr Phe
 1 5

55 <210> 95
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Péptido
 <400> 95

His Arg Phe Pro Val Thr Phe Gly
 1 5

65 <210> 96
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

70 <220>
 <223> Péptido
 <400> 96

75 Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe
 1 5

80 <210> 97
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido
 5 <400> 97
 Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His
 1 5
 10
 <210> 98
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 98
 20 Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro
 1 5
 25
 <210> 99
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 99
 35 Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu
 1 5
 40
 <210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 100
 50 Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu
 1 5
 55
 <210> 101
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 101
 Ser Asn Phe His Pro Leu Leu Val
 1 5
 65
 <210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 70
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 102
 Asn Phe His Pro Leu Leu Val Ser
 1 5
 80
 <210> 103
 <211> 8
 <212> PRT

	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
5	<223>	Péptido
	<400>	103
	Phe His Pro Leu Leu Val Ser Gly	
10	1	5
	<210>	104
	<211>	8
15	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Péptido
20	<400>	104
	His Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg	
	1	5
25	<210>	105
	<211>	8
	<212>	PRT
30	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	105
35	Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu	
	1	5
40	<210>	106
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
45	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	106
50	Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg	
	1	5
55	<210>	107
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
60	<223>	Péptido
	<400>	107
65	Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile	
	1	5
	<210>	108
70	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
75	<223>	Péptido
	<400>	108
	Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile Pro	
80	1	5
	<210>	109
	<211>	8

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido
 <400> 109
 10 Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His
 1 5
 15 <210> 110
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Péptido
 <400> 110
 25 Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe
 1 5
 30 <210> 111
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Péptido
 <400> 111
 Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val
 1 5
 40 <210> 112
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Péptido
 <400> 112
 50 Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser
 1 5
 55 <210> 113
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Péptido
 <400> 113
 65 Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu
 1 5
 70 <210> 114
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 75 <220>
 <223> Péptido
 <400> 114
 80 Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys
 1 5
 <210> 115

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido
 <400> 115
 10 Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln
 1 5
 15 <210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Péptido
 <400> 116
 25 His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys
 1 5
 30 <210> 117
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Péptido
 <400> 117
 40 Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr
 1 5
 45 <210> 118
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 50 <400> 118
 Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser
 1 5
 55 <210> 119
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Péptido
 <400> 119
 65 Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu
 1 5
 70 <210> 120
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 75 <220>
 <223> Péptido
 <400> 120
 80 Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val
 1 5

5	<210>	127
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
10	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	127
	Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile 1 5	
15	<210>	128
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
20	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	128
	Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile Pro 1 5	
30	<210>	129
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
35	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	129
	Asn Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys 1 5	
45	<210>	130
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
50	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	130
	Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr 1 5	
55	<210>	131
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
60	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	131
	Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu 1 5	
65	<210>	132
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
70	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	132
	Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr 1 5	
75	<210>	132
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
80	<220>	
	<223>	Péptido
	<400>	132
	Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr 1 5	

5	<210> 133 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Péptido
15	<400> 133 Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp 1 5
20	<210> 134 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
25	<220> <223> Péptido
30	<400> 134 Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp His 1 5
35	<210> 135 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Péptido
45	<400> 135 Pro Lys Thr Leu Thr Trp His Ser 1 5
50	<210> 136 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
55	<220> <223> Péptido
60	<400> 136 Lys Thr Leu Thr Trp His Ser Ala 1 5
65	<210> 137 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
70	<220> <223> Péptido
75	<400> 137 Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys 1 5
80	<210> 138 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Péptido
	<400> 138

	Glu Ala Val Tyr Phe His Gln His
	1 5
5	<210> 139 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Péptido <400> 139
15	Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser
	1 5
20	<210> 140 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
25	<220> <223> Péptido <400> 140
30	Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile
	1 5
35	<210> 141 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Péptido <400> 141
45	Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu
	1 5
50	<210> 142 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Péptido
55	<400> 142
	Phe His Gln His Ser Ile Leu Ala
	1 5
60	<210> 143 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
65	<220> <223> Péptido <400> 143
70	Lys Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr
	1 5
75	<210> 144 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
80	<220> <223> Péptido <400> 144

Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser
 1 5
 5
 <210> 145
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 145
 15
 Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser
 1 5
 20
 <210> 146
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 146
 30
 Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg
 1 5
 35
 <210> 147
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 147
 45
 Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Cys
 1 5
 50
 <210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 148
 Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr
 1 5
 60
 <210> 149
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> Péptido
 70
 <400> 149
 Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys
 1 5
 75
 <210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 80
 <220>
 <223> Péptido

<400> 150
 Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly
 1 5
 5
 <210> 151
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 15 <400> 151
 Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His
 1 5
 20 <210> 152
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 30 <400> 152
 Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys
 1 5
 35 <210> 153
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Péptido
 <400> 153
 45 Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr
 1 5
 50 <210> 154
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Péptido
 <400> 154
 60 Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys
 1 5
 65 <210> 155
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 70 <400> 155
 Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser
 1 5
 75 <210> 156
 <211> 8
 <212> PRT
 80 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido

	<400>	156
5	Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp	1 5
10	<210> 157 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Péptido	
	<400>	157
20	Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp Gln	1 5
25	<210> 158 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Péptido	
	<400>	158
35	His Cys Tyr Lys Ser Asp Gln Ala	1 5
40	<210> 159 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Péptido	
45	<400>	159
	Cys Tyr Lys Ser Asp Gln Ala Leu	1 5
50	<210> 160 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Péptido	
	<400>	160
60	Tyr Lys Ser Asp Gln Ala Leu His	1 5
65	<210> 161 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Péptido	
	<400>	161
75	Lys Ser Asp Gln Ala Leu His Ser	1 5
80	<210> 162 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Péptido
	<400> 162
5	Ser Asp Gln Ala Leu His Ser Phe 1 5
10	<210> 163 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
15	<220> <223> Péptido <400> 163
20	Asp Gln Ala Leu His Ser Phe Ser 1 5
25	<210> 164 <211> 1722 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 164
30	Met Arg Thr Gly Trp Ala Thr Pro Arg Arg Pro Ala Gly Leu Leu Met 1 5 10 15
35	Leu Leu Phe Trp Phe Phe Asp Leu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ala Ala 20 25 30
40	Asn Asp Pro Phe Thr Ile Val His Gly Asn Thr Gly Lys Cys Ile Lys 35 40 45
45	Pro Val Tyr Gly Trp Ile Val Ala Asp Asp Cys Asp Glu Thr Glu Asp 50 55 60
50	Lys Leu Trp Lys Trp Val Ser Gln His Arg Leu Phe His Leu His Ser 65 70 75 80
55	Gln Lys Cys Leu Gly Leu Asp Ile Thr Lys Ser Val Asn Glu Leu Arg 85 90 95
60	Met Phe Ser Cys Asp Ser Ser Ala Met Leu Trp Trp Lys Cys Glu His 100 105 110
65	His Ser Leu Tyr Gly Ala Ala Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Asp Gly 115 120 125
70	His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys Lys Gly Gly 130 135 140
75	Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr Thr Arg 145 150 155 160
80	Asp Gly Asn Ser Tyr Gly Arg Pro Cys Glu Phe Pro Phe Leu Ile Asp 165 170 175
85	Gly Thr Trp His His Asp Cys Ile Leu Asp Glu Asp His Ser Gly Pro 180 185 190
90	Trp Cys Ala Thr Thr Leu Asn Tyr Glu Tyr Asp Arg Lys Trp Gly Ile 195 200 205
95	Cys Leu Lys Pro Glu Asn Gly Cys Glu Asp Asn Trp Glu Lys Asn Glu 210 215 220

5	Gln 225	Phe	Gly	Ser	Cys	Tyr 230	Gln	Phe	Asn	Thr	Gln 235	Thr	Ala	Leu	Ser	Trp 240
10	Lys	Glu	Ala	Tyr	Val 245	Ser	Cys	Gln	Asn	Gln 250	Gly	Ala	Asp	Leu	Leu 255	Ser
15	Ile	Asn	Ser	Ala 260	Ala	Glu	Leu	Thr	Tyr 265	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu 270	Gly	Ile
20	Ala	Lys	Ile 275	Phe	Trp	Ile	Gly	Leu 280	Asn	Gln	Leu	Tyr	Ser 285	Ala	Arg	Gly
25	Trp	Glu 290	Trp	Ser	Asp	His	Lys 295	Pro	Leu	Asn	Phe	Leu 300	Asn	Trp	Asp	Pro
30	Asp 305	Arg	Pro	Ser	Ala	Pro 310	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser 315	Ser	Cys	Ala	Arg	Met 320
35	Asp	Ala	Glu	Ser	Gly 325	Leu	Trp	Gln	Ser	Phe 330	Ser	Cys	Glu	Ala	Gln 335	Leu
40	Pro	Tyr	Val	Cys 340	Arg	Lys	Pro	Leu	Asn 345	Asn	Thr	Val	Glu	Leu 350	Thr	Asp
45	Val	Trp	Thr 355	Tyr	Ser	Asp	Thr	Arg 360	Cys	Asp	Ala	Gly	Trp 365	Leu	Pro	Asn
50	Asn	Gly 370	Phe	Cys	Tyr	Leu	Leu 375	Val	Asn	Glu	Ser	Asn 380	Ser	Trp	Asp	Lys
55	Ala 385	His	Ala	Lys	Cys	Lys 390	Ala	Phe	Ser	Ser	Asp 395	Leu	Ile	Ser	Ile	His 400
60	Ser	Leu	Ala	Asp	Val 405	Glu	Val	Val	Val	Thr 410	Lys	Leu	His	Asn	Glu 415	Asp
65	Ile	Lys	Glu	Glu 420	Val	Trp	Ile	Gly	Leu 425	Lys	Asn	Ile	Asn	Ile 430	Pro	Thr
70	Leu	Phe	Gln 435	Trp	Ser	Asp	Gly	Thr 440	Glu	Val	Thr	Leu	Thr 445	Tyr	Trp	Asp
75	Glu	Asn 450	Glu	Pro	Asn	Val	Pro 455	Tyr	Asn	Lys	Thr	Pro 460	Asn	Cys	Val	Ser
80	Tyr 465	Leu	Gly	Glu	Leu	Gly 470	Gln	Trp	Lys	Val	Gln 475	Ser	Cys	Glu	Glu	Lys 480
85	Leu	Lys	Tyr	Val	Cys 485	Lys	Arg	Lys	Gly	Glu 490	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala 495	Ser
90	Ser	Asp	Lys	Met 500	Cys	Pro	Pro	Asp	Glu 505	Gly	Trp	Lys	Arg	His 510	Gly	Glu
95	Thr	Cys	Tyr 515	Lys	Ile	Tyr	Glu	Asp 520	Glu	Val	Pro	Phe	Gly 525	Thr	Asn	Cys
100	Asn	Leu 530	Thr	Ile	Thr	Ser	Arg 535	Phe	Glu	Gln	Glu	Tyr 540	Leu	Asn	Asp	Leu

Met Lys Lys Tyr Asp Lys Ser Leu Arg Lys Tyr Phe Trp Thr Gly Leu
 545 550 555 560
 5 Arg Asp Val Asp Ser Cys Gly Glu Tyr Asn Trp Ala Thr Val Gly Gly
 565 570 575
 10 Arg Arg Arg Ala Val Thr Phe Ser Asn Trp Asn Phe Leu Glu Pro Ala
 580 585 590
 15 Ser Pro Gly Gly Cys Val Ala Met Ser Thr Gly Lys Ser Val Gly Lys
 595 600 605
 20 Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser Ile Cys Lys
 610 615 620
 25 Lys Met Ser Gly Pro Leu Gly Pro Glu Glu Ala Ser Pro Lys Pro Asp
 625 630 635 640
 30 Asp Pro Cys Pro Glu Gly Trp Gln Ser Phe Pro Ala Ser Leu Ser Cys
 645 650 655
 35 Tyr Lys Val Phe His Ala Glu Arg Ile Val Arg Lys Arg Asn Trp Glu
 660 665 670
 40 Glu Ala Glu Arg Phe Cys Gln Ala Leu Gly Ala His Leu Ser Ser Phe
 675 680 685
 45 Ser His Val Asp Glu Ile Lys Glu Phe Leu His Phe Leu Thr Asp Gln
 690 695 700
 50 Phe Ser Gly Gln His Trp Leu Trp Ile Gly Leu Asn Lys Arg Ser Pro
 705 710 715 720
 55 Asp Leu Gln Gly Ser Trp Gln Trp Ser Asp Arg Thr Pro Val Ser Thr
 725 730 735
 60 Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr Asp Ile Arg Asp Cys
 740 745 750
 65 Ala Ala Val Lys Val Phe His Arg Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe
 755 760 765
 70 Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Phe Ala Cys Asp Thr
 770 775 780
 75 Lys Leu Glu Trp Val Cys Gln Ile Pro Lys Gly Arg Thr Pro Lys Thr
 785 790 795 800
 80 Pro Asp Trp Tyr Asn Pro Asp Arg Ala Gly Ile His Gly Pro Pro Leu
 805 810 815
 85 Ile Ile Glu Gly Ser Glu Tyr Trp Phe Val Ala Asp Leu His Leu Asn
 820 825 830
 90 Tyr Glu Glu Ala Val Leu Tyr Cys Ala Ser Asn His Ser Phe Leu Ala
 835 840 845
 95 Thr Ile Thr Ser Phe Val Gly Leu Lys Ala Ile Lys Asn Lys Ile Ala
 850 855 860
 100 Asn Ile Ser Gly Asp Gly Gln Lys Trp Trp Ile Arg Ile Ser Glu Trp
 865 870 875 880

Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe
 885 890 895
 5 Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys Thr Trp
 900 905 910
 10 Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys Leu Pro Phe
 915 920 925
 15 Ile Cys Glu Lys Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Lys Tyr Ser Pro Asp
 930 935 940
 20 Ser Ala Ala Lys Val Gln Cys Ser Glu Gln Trp Ile Pro Phe Gln Asn
 945 950 955 960
 Lys Cys Phe Leu Lys Ile Lys Pro Val Ser Leu Thr Phe Ser Gln Ala
 965 970 975
 25 Ser Asp Thr Cys His Ser Tyr Gly Gly Thr Leu Pro Ser Val Leu Ser
 980 985 990
 30 Gln Ile Glu Gln Asp Phe Ile Thr Ser Leu Leu Pro Asp Met Glu Ala
 995 1000 1005
 35 Thr Leu Trp Ile Gly Leu Arg Trp Thr Ala Tyr Glu Lys Ile Asn
 1010 1015 1020
 Lys Trp Thr Asp Asn Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro
 1025 1030 1035
 40 Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu
 1040 1045 1050
 45 Glu Glu Ser Arg Tyr His Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys
 1055 1060 1065
 50 Ser Pro Phe Thr Gly Thr Trp Asn Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg
 1070 1075 1080
 55 His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys Ser Arg
 1085 1090 1095
 Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn
 1100 1105 1110
 60 Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys
 1115 1120 1125
 65 Arg Glu Cys Leu Lys Ser Asn Met Gln Leu Val Ser Ile Thr Asp
 1130 1135 1140
 70 Pro Tyr Gln Gln Ala Phe Leu Ser Val Gln Ala Leu Leu His Asn
 1145 1150 1155
 75 Ser Ser Leu Trp Ile Gly Leu Phe Ser Gln Asp Asp Glu Leu Asn
 1160 1165 1170
 Phe Gly Trp Ser Asp Gly Lys Arg Leu His Phe Ser Arg Trp Ala
 1175 1180 1185
 80 Glu Thr Asn Gly Gln Leu Glu Asp Cys Val Val Leu Asp Thr Asp
 1190 1195 1200

5	Gly	Phe 1205	Trp	Lys	Thr	Val	Asp 1210	Cys	Asn	Asp	Asn	Gln 1215	Pro	Gly	Ala
10	Ile	Cys 1220	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Asn 1225	Glu	Thr	Glu	Lys	Glu 1230	Val	Lys	Pro
15	Val	Asp 1235	Ser	Val	Lys	Cys	Pro 1240	Ser	Pro	Val	Leu	Asn 1245	Thr	Pro	Trp
20	Ile	Pro 1250	Phe	Gln	Asn	Cys	Cys 1255	Tyr	Asn	Phe	Ile	Ile 1260	Thr	Lys	Asn
25	Arg	His 1265	Met	Ala	Thr	Thr	Gln 1270	Asp	Glu	Val	His	Thr 1275	Lys	Cys	Gln
30	Lys	Leu 1280	Asn	Pro	Lys	Ser	His 1285	Ile	Leu	Ser	Ile	Arg 1290	Asp	Glu	Lys
35	Glu	Asn 1295	Asn	Phe	Val	Leu	Glu 1300	Gln	Leu	Leu	Tyr	Phe 1305	Asn	Tyr	Met
40	Ala	Ser 1310	Trp	Val	Met	Leu	Gly 1315	Ile	Thr	Tyr	Arg	Asn 1320	Lys	Ser	Leu
45	Met	Trp 1325	Phe	Asp	Lys	Thr	Pro 1330	Leu	Ser	Tyr	Thr	His 1335	Trp	Arg	Ala
50	Gly	Arg 1340	Pro	Thr	Ile	Lys	Asn 1345	Glu	Lys	Phe	Leu	Ala 1350	Gly	Leu	Ser
55	Thr	Asp 1355	Gly	Phe	Trp	Asp	Ile 1360	Gln	Thr	Phe	Lys	Val 1365	Ile	Glu	Glu
60	Ala	Val 1370	Tyr	Phe	His	Gln	His 1375	Ser	Ile	Leu	Ala	Cys 1380	Lys	Ile	Glu
65	Met	Val 1385	Asp	Tyr	Lys	Glu	Glu 1390	Tyr	Asn	Thr	Thr	Leu 1395	Pro	Gln	Phe
70	Met	Pro 1400	Tyr	Glu	Asp	Gly	Ile 1405	Tyr	Ser	Val	Ile	Gln 1410	Lys	Lys	Val
75	Thr	Trp 1415	Tyr	Glu	Ala	Leu	Asn 1420	Met	Cys	Ser	Gln	Ser 1425	Gly	Gly	His
80	Leu	Ala 1430	Ser	Val	His	Asn	Gln 1435	Asn	Gly	Gln	Leu	Phe 1440	Leu	Glu	Asp
	Ile	Val 1445	Lys	Arg	Asp	Gly	Phe 1450	Pro	Leu	Trp	Val	Gly 1455	Leu	Ser	Ser
	His	Asp 1460	Gly	Ser	Glu	Ser	Ser 1465	Phe	Glu	Trp	Ser	Asp 1470	Gly	Ser	Thr
	Phe	Asp 1475	Tyr	Ile	Pro	Trp	Lys 1480	Gly	Gln	Thr	Ser	Pro 1485	Gly	Asn	Cys
	Val	Leu 1490	Leu	Asp	Pro	Lys	Gly 1495	Thr	Trp	Lys	His	Glu 1500	Lys	Cys	Asn

Ser Val Lys Asp Gly Ala Ile Cys Tyr Lys Pro Thr Lys Ser Lys
 1505 1510 1515
 5 Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Cys Pro Ala Ala Lys
 1520 1525 1530
 10 Glu Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys
 1535 1540 1545
 15 Ser Asp Gln Ala Leu His Ser Phe Ser Glu Ala Lys Lys Leu Cys
 1550 1555 1560
 20 Ser Lys His Asp His Ser Ala Thr Ile Val Ser Ile Lys Asp Glu
 1565 1570 1575
 Asp Glu Asn Lys Phe Val Ser Arg Leu Met Arg Glu Asn Asn Asn
 1580 1585 1590
 25 Ile Thr Met Arg Val Trp Leu Gly Leu Ser Gln His Ser Val Asp
 1595 1600 1605
 30 Gln Ser Trp Ser Trp Leu Asp Gly Ser Glu Val Thr Phe Val Lys
 1610 1615 1620
 35 Trp Glu Asn Lys Ser Lys Ser Gly Val Gly Arg Cys Ser Met Leu
 1625 1630 1635
 40 Ile Ala Ser Asn Glu Thr Trp Lys Lys Val Glu Cys Glu His Gly
 1640 1645 1650
 Phe Gly Arg Val Val Cys Lys Val Pro Leu Gly Pro Asp Tyr Thr
 1655 1660 1665
 45 Ala Ile Ala Ile Ile Val Ala Thr Leu Ser Ile Leu Val Leu Met
 1670 1675 1680
 50 Gly Gly Leu Ile Trp Phe Leu Phe Gln Arg His Arg Leu His Leu
 1685 1690 1695
 55 Ala Gly Phe Ser Ser Val Arg Tyr Ala Gln Gly Val Asn Glu Asp
 1700 1705 1710
 Glu Ile Met Leu Pro Ser Phe His Asp
 1715 1720
 60
 <210> 165
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> Péptido
 70
 <400> 165
 Cys Ile Lys Pro Val Tyr Gly Trp Ile Val Ala Asp Asp Cys Asp Glu
 1 5 10 15
 75 Thr Glu Asp Lys Leu Trp Lys
 20
 80
 <210> 166
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido
 5 <400> 166
 Cys Glu His His Ser Leu Tyr Gly Ala Ala Arg
 1 5 10
 10 <210> 167
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido
 <400> 167
 20 Asp Gly His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 25 Gly Gly Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr
 20 25 30
 Thr Arg
 30
 <210> 168
 <211> 19
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 40 <400> 168
 Lys Gly Gly Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile
 1 5 10 15
 45 Tyr Thr Arg
 50 <210> 169
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Péptido
 <400> 169
 60 Gly Gly Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr
 1 5 10 15
 65 Thr Arg
 70 <210> 170
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 75 <400> 170
 Asp Gly His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys
 1 5 10 15
 80
 <210> 171
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido
 <400> 171
 10 Trp Gly Ile Cys Leu Lys Pro Glu Asn Gly Cys Glu Asp Asn Trp Glu
 1 5 10 15
 Lys
 15
 <210> 172
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 25 <400> 172
 Ile Phe Trp Ile Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ser Ala Arg
 1 5 10
 30
 <210> 173
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 173
 40 Leu His Asn Glu Asp Ile Lys Glu Glu Val Trp Ile Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 45
 <210> 174
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 174
 55 Thr Pro Asn Cys Val Ser Tyr Leu Gly Glu Leu Gly Gln Trp Lys
 1 5 10 15
 60
 <210> 175
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 175
 70 Tyr Phe Trp Thr Gly Leu Arg Asp Val Asp Ser Cys Gly Glu Tyr Asn
 1 5 10 15
 Trp Ala Thr Val Gly Gly Arg
 20
 75
 <210> 176
 <211> 11
 <212> PRT
 80 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido

<400> 176
 5 Ser Val Gly Lys Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg
 1 5 10
 <210> 177
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 15 <400> 177
 Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys
 1 5 10
 20 <210> 178
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 30 <400> 178
 Ala Leu Ser Ile Cys Lys Lys
 1 5
 35 <210> 179
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 45 <400> 179
 Pro Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe His Ala
 1 5 10
 50 <210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Péptido
 <400> 180
 60 Arg Asn Trp Glu Glu Ala Glu Arg
 1 5
 65 <210> 181
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 70 <223> Péptido
 <400> 181
 Arg Ser Pro Asp Leu Gln Gly Ser Trp Gln Trp Ser Asp Arg Thr Pro
 1 5 10 15
 80 Val Ser Thr Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr Asp Ile
 20 25 30
 Arg

5	<210> 182 <211> 19 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Péptido <400> 182
15	Thr Pro Val Ser Thr Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr 1 5 10 15
20	Asp Ile Arg
25	<210> 183 <211> 20 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Péptido <400> 183
35	Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr 1 5 10 15
40	Leu Arg Pro Phe 20
45	<210> 184 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
50	<220> <223> Péptido <400> 184
55	Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg 1 5
60	<210> 185 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial
65	<220> <223> Péptido <400> 185
70	Ile Ser Glu Trp Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg 1 5 10
75	<210> 186 <211> 19 <212> PRT <213> Secuencia artificial
80	<220> <223> Péptido <400> 186
85	Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro Val 1 5 10 15
90	Thr Phe Gly

5 <210> 187
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 10 <400> 187
 Phe Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys Thr
 1 5 10 15
 15 Trp Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys
 20 25 30
 20 <210> 188
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Péptido
 <400> 188
 30 Thr Trp Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys
 1 5 10 15
 35 <210> 189
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Péptido
 <400> 189
 45 Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Lys
 1 5
 50 <210> 190
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 55 <400> 190
 Val Gln Cys Ser Glu Gln Trp Ile Pro Phe Gln Asn
 1 5 10
 60 <210> 191
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 70 <400> 191
 Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu
 1 5 10
 75 <210> 192
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 80 <220>
 <223> Péptido

<400> 192
 Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu
 1 5 10 15
 Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu Glu Glu Ser Arg Tyr His Cys Ala
 20 25 30
 Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys
 35
 <210> 193
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 193
 Tyr His Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys
 1 5 10
 <210> 194
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 194
 Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr
 1 5 10 15
 Ser
 <210> 195
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 195
 His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys
 1 5
 <210> 196
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 196
 Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys
 1 5 10
 <210> 197
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 197

	Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile
	1 5 10
5	
	<210> 198
	<211> 8
	<212> PRT
10	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Péptido
	<400> 198
15	
	Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys
	1 5
20	
	<210> 199
	<211> 14
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
25	
	<220>
	<223> Péptido
	<400> 199
30	
	Asn Arg His Met Ala Thr Thr Gln Asp Glu Val His Thr Lys
	1 5 10
35	
	<210> 200
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
40	
	<220>
	<223> Péptido
	<400> 200
45	
	Ser His Ile Leu Ser Ile Arg
	1 5
50	
	<210> 201
	<211> 16
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
55	
	<220>
	<223> Péptido
	<400> 201
60	
	Ser Leu Met Trp Phe Asp Lys Thr Pro Leu Ser Tyr Thr His Trp Arg
	1 5 10 15
65	
	<210> 202
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
70	
	<220>
	<223> Péptido
	<400> 202
75	
	Ser Leu Met Trp Phe Asp Lys
	1 5
80	
	<210> 203
	<211> 11
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Péptido

<400> 203
 Glu Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu
 1 5 10
 5
 <210> 204
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 15 <400> 204
 Lys Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser
 1 5 10
 20
 <210> 205
 <211> 20
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 30 <400> 205
 Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp
 1 5 10 15
 35 Gln Ala Leu His
 20
 40 <210> 206
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 45 <400> 206
 His Asp His Ser Ala Thr Ile Val Ser Ile Lys Asp Glu Asp Glu Asn
 1 5 10 15
 50
 Lys Phe Val Ser Arg
 20
 55
 <210> 207
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 65 <400> 207
 Val Glu Cys Glu His Gly Phe Gly Arg
 1 5
 70