

ANTICUERPO ANTI-LILRB1 Y USOS DEL MISMO

CAMPO TÉCNICO

5

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica los beneficios del documento KR 10-2019-0173414
presentado el 23 de diciembre de 2019 y el documento KR 10-2020-0061907
10 presentado el 22 de mayo de 2020 en la Oficina Surcoreana de Propiedad Industrial,
cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia.

La divulgación se refiere a un anticuerpo anti-LILRB1 y a los usos del mismo.
Más específicamente, se proporcionan un anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de
15 unión a antígeno del mismo, y el uso del mismo para terapia contra el cáncer.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

El miembro 1 de la subfamilia B del receptor de tipo inmunoglobulina de
20 leucocitos (LILRB1; también conocido como ILT2, CD85j o LIR-1) es un receptor
inhibidor, que se expresa en células tales como células B, células T, células NK, células
dendríticas, macrófagos y otras células inmunitarias. LILRB1 participa en un mecanismo
de transducción de señales de inhibición de las actividades de células inmunitarias
mediante la unión a MHC de clase I clásico y no clásico.

25

Mientras tanto, se ha notificado que diversas células cancerosas sobreexpresan
MHC de clase I tal como HLA-G para la evasión inmunitaria. Se espera que el bloqueo
de la unión de LILRB1 a MHC de clase I permita la recuperación de las actividades
inhibidas de las células inmunitarias, presentando de ese modo efectos
30 anticancerígenos.

Por tanto, se requiere desarrollar un agente novedoso que se una a LILRB1 y
que bloquee la unión de LILRB1 a MHC de clase I y/o la interacción entre LILRB1 y
MHC de clase I.

35

DIVULGACIÓN

PROBLEMA TÉCNICO

Esta divulgación proporciona anticuerpos que se unen a LILRB1, actúan sobre las células inmunitarias que expresan LILRB1, regulan las actividades de las células inmunitarias, y presentan efectos anticancerígenos, y usos de los mismos para terapias contra el cáncer.

Una realización proporciona un anticuerpo anti-LILRB1 que se une a LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener una actividad para bloquear la unión de LILRB1 a MHC de clase I y/o bloquear la interacción entre LILRB1 y MHC de clase I. Además, el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener una actividad para inhibir la evasión inmunitaria de células cancerosas. Además, el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener un efecto anticancerígeno. El efecto anticancerígeno puede ser contra una célula cancerosa que expresa o sobreexpresa MHC de clase I sobre su superficie celular.

Otra realización proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de un cáncer, comprendiendo la composición el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como principio activo.

Otra realización proporciona una composición farmacéutica para la inhibición de la unión de LILRB1 a MHC de clase I y/o el bloqueo de la interacción entre LILRB1 y MHC de clase I, comprendiendo la composición el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como principio activo.

Otra realización proporciona una composición farmacéutica para inhibir la evasión inmunitaria de una célula cancerosa, comprendiendo la composición el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como principio activo.

SOLUCIÓN TÉCNICA

Una realización proporciona un anticuerpo anti-LILRB1 que se une a LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de

unión a antígeno del mismo puede tener una actividad para bloquear la unión de LILRB1 a MHC de clase I y/o bloquear la interacción entre LILRB1 y MHC de clase I. Además, el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener una actividad para inhibir la evasión inmunitaria de células cancerosas.

5 Además, el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener un efecto anticancerígeno.

El anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):

10

(1) basadas en la definición de CDR según la numeración de Kabat (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. y Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición. n.º de publicación de NIH 91-3242; <http://www.abysis.org/>),

15

una CDR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109 ó 115,

una CDR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 8, 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110 ó 116,

20

una CDR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111 ó 117,

una CDR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112 ó 118,

una CDR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113 ó 119, y

25

una CDR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114 ó 120; o

(2) basadas en la definición de CDR según la numeración de IMGT (<http://www.imgt.org/>),

30

una CDR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121, 126, 131, 136, 141, 146, 151, 156, 161, 166, 171, 176, 181, 186, 191, 196, 201, 206, 211 ó 216,

35

una CDR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122, 127, 132, 137, 142, 147, 152, 157, 162, 167, 172, 177, 182, 187, 192, 197, 202, 207, 212 ó 217,

una CDR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 9,

15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111 ó 117,

una CDR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123, 128, 133, 138, 143, 148, 153, 158, 163, 168, 173, 178, 183, 188, 193, 198, 203, 208, 213 ó 218,

una CDR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, 129, 134, 139, 144, 149, 154, 159, 164, 169, 174, 179, 184, 189, 194, 199, 204, 209, 214 ó 219, y

una CDR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215 ó 220.

En una realización específica, combinaciones de 6 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) que pueden estar comprendidas en el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en esta divulgación se ilustran en la tabla 1:

TABLA 1

	CDR	Secuencia de aminoácidos (N→C) (Kabat)	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos (N→C) (IMGT)	SEQ ID NO
E3/E 3.1	CDR-L1	QGDSLRFNYAS	1	SLRFNY	121
	CDR-L2	GKNNRPS	2	GKN	122
	CDR-L3	NSRDSSGSHLTGV	3	NSRDSSGSHLTGV	3
	CDR-H1	SYAMS	4	GFTFSSYA	123
	CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG	5	ISGSGGST	124
	CDR-H3	DTYYYGSGRSNAFDI	6	ARDTTYGSGRSNAFDI	125
B3	CDR-L1	QASQDISNYLN	7	QDISNY	126
	CDR-L2	DASNLET	8	DAS	127
	CDR-L3	QQYDNLP	9	QQYDNLP	9
	CDR-H1	DYAMH	10	GFTFDDYA	128
	CDR-H2	GISWNSGSIQYADSVKG	11	ISWNSGSI	129
	CDR-H3	VGDSSGWSDAFDI	12	ARVGDSSGWSDAFDI	130
A10	CDR-L1	RASQSVSSNLA	13	QSVSSN	131
	CDR-L2	GASTRAT	14	GAS	132
	CDR-L3	QQYGSSPRMYT	15	QQYGSSPRMYT	15
	CDR-H1	SYAIS	16	GGTFSSYA	133

	CDR-H2	GIIPFGTANYAQKFQG	17	IIPFGTA	134
	CDR-H3	GGLGELDNWFDP	18	ARGGLGELDNWFDP	135
G1	CDR-L1	SGYKLGDRYVS	19	KLGDY	136
	CDR-L2	KDSQRPS	20	KDS	137
	CDR-L3	QAWDSGTGV	21	QAWDSGTGV	21
	CDR-H1	SYGIS	22	GGTFSSYG	138
	CDR-H2	WISAYNGNTNYAQELQG	23	ISAYNGNT	139
	CDR-H3	VGVAGKLDY	24	ARVGVAGKLDY	140
G9	CDR-L1	TGSSSDVGGYNYVS	25	SSDVGGYNY	141
	CDR-L2	DVSNRPS	26	DVS	142
	CDR-L3	SSYTGSSSTLDVL	27	SSYTGSSSTLDVL	27
	CDR-H1	SYWIG	28	GYSFTSYW	143
	CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG	29	IYPGSDT	144
	CDR-H3	QYYDGGYYMDV	30	ASQYYDGGYYMDV	145
H2	CDR-L1	QGDSLRNYYAS	31	SLRNYY	146
	CDR-L2	GNNKRPS	32	GNN	147
	CDR-L3	NSLDSTYNHPI	33	NSLDSTYNHPI	33
	CDR-H1	SYDIH	34	GYTFTSYD	148
	CDR-H2	WISAYNGNTNYAQKLQG	35	ISAYNGNT	149
	CDR-H3	DGGDAFDI	36	ARDGGDAFDI	150
H11	CDR-L1	QGDSLRSYAS	37	SLRSYY	151
	CDR-L2	GRNNRPS	38	GRN	152
	CDR-L3	KSRDSSGNHYV	39	KSRDSSGNHYV	39
	CDR-H1	SYMH	40	GYTFTSY	153
	CDR-H2	IINPSGGSTSYAQKFQG	41	INPSGGST	154
	CDR-H3	DAGSSSDY	42	ARDAGSSSDY	155
F12	CDR-L1	AGTSSDIGDYDYVS	43	SSDIGDYDY	156
	CDR-L2	DVSR RPS	44	DVS	157
	CDR-L3	ASYTSSSVVV	45	ASYTSSSVVV	45
	CDR-H1	SYWIG	46	GYSFTSYW	158
	CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG	47	IYPGSDT	159
	CDR-H3	QYYDGGYYMDV	48	ASQYYDGGYYMDV	160
B9	CDR-L1	RASQISRYLN	49	QSISRY	161
	CDR-L2	GASSLQS	50	GAS	162
	CDR-L3	QQAYGFPLT	51	QQAYGFPLT	51
	CDR-H1	SYAIS	52	GGTFSSYA	163
	CDR-H2	GIIPFGTANYAQKFQG	53	IIPFGTA	164
	CDR-H3	GEIAVAQNWDYYGMDV	54	ARGEIAVAQNWDYYGMDV	165
G11	CDR-L1	TGTSSDVGGYNYVS	55	SSDVGGYNY	166
	CDR-L2	DVSKRPS	56	DVS	167
	CDR-L3	SSYSSSSTLVV	57	SSYSSSSTLVV	57

	CDR-H1	SYWIG	58	GYSFTSYW	168
	CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG	59	IYPGSDT	169
	CDR-H3	QYYDGGYYMDV	60	ASQYYDGGYYMDV	170
G6	CDR-L1	QGDSLRRYYAT	61	SLRRYY	171
	CDR-L2	GQNYRPS	62	GQN	172
	CDR-L3	NSRDSSGNHV V	63	NSRDSSGNHV V	63
	CDR-H1	SYMH	64	GYTFTSYY	173
	CDR-H2	GIIPFGTANYAQKFQG	65	IIPFGTA	174
	CDR-H3	GWGYSSSFYD	66	ARGWGYSSSFYD	175
F11	CDR-L1	SGSSSNIGTNTVN	67	SSNIGTNT	176
	CDR-L2	SNDQRPS	68	SND	177
	CDR-L3	ETWDDSLKGPV	69	ETWDDSLKGPV	69
	CDR-H1	SYAMS	70	GFTFSSYA	178
	CDR-H2	TISGSGDSTYYADSVKG	71	ISGSGDST	179
	CDR-H3	EWELGDAFDI	72	AREWELGDAFDI	180
D3	CDR-L1	RASQSISSYLN	73	QSISSY	181
	CDR-L2	AASSLQS	74	AAS	182
	CDR-L3	QQSYSTRWT	75	QQSYSTRWT	75
	CDR-H1	SYAMS	76	GSTFSSYA	183
	CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG	77	ISGSGGST	184
	CDR-H3	DRGSYGYYYGMDV	78	AKDRGSYGYYYGMD V	185
B12	CDR-L1	RASQSISSYLN	79	QSISSY	186
	CDR-L2	AASSLQS	80	AAS	187
	CDR-L3	QQSYSTLRT	81	QQSYSTLRT	81
	CDR-H1	GYMH	82	GYTFTGY	188
	CDR-H2	WINPNSGGTNYAQKFQG	83	INPNSGGT	189
	CDR-H3	AGASIVGATALDY	84	TRAGASIVGATALDY	190
E4	CDR-L1	TRSSGSIASNYVQ	85	SGSIASNY	191
	CDR-L2	EDNQRPS	86	EDN	192
	CDR-L3	QSYDTGNRNYV	87	QSYDTGNRNYV	87
	CDR-H1	SYTIS	88	GGTFSSYT	193
	CDR-H2	RIIPILGIANYAQKFQG	89	IIPILGIA	194
	CDR-H3	GPSLNYAGYFDN	90	VRGPSLNYAGYFDN	195
E12	CDR-L1	QGDSLRSYYAS	91	SLRSYY	196
	CDR-L2	GKEKRPS	92	GKE	197
	CDR-L3	NSRGSTTDYMV	93	NSRGSTTDYMV	93
	CDR-H1	SYAMH	94	GFTFSSYA	198
	CDR-H2	VISYDGSNKYYADSVKG	95	ISYDGSNK	199
	CDR-H3	ERGS GMDV	96	ARERGSGMDV	200
D1	CDR-L1	KASQDIDDDMN	97	QDIDDD	201
	CDR-L2	EASTLVP	98	EAS	202

	CDR-L3	LQHDKFPYT	99	LQHDKFPYT	99
	CDR-H1	SYGIS	100	GYTFTSYG	203
	CDR-H2	WINPNSGGTNYAQKFQG	101	INPNSGGT	204
	CDR-H3	RGVDEGDY	102	ASRGVDEGDY	205
E6	CDR-L1	TGSSGNIASNYVQ	103	SGNIASNY	206
	CDR-L2	RDDQRPS	104	RDD	207
	CDR-L3	QSYDSSSWV	105	QSYDSSSWV	105
	CDR-H1	TYDIT	106	GYTFTTYD	208
	CDR-H2	WMNPNSGNSRSAQKFQG	107	MNPNSGNS	209
	CDR-H3	GDYSGVVLATALDY	108	ATGDYSGVVLATALD Y	210
E9	CDR-L1	SGSSSNIGNNYVY	109	SSNIGNNY	211
	CDR-L2	RNNQRPS	110	RNN	212
	CDR-L3	AAWDDSLSGWV	111	AAWDDSLSGWV	111
	CDR-H1	SYGMH	112	GFTFSSYG	213
	CDR-H2	NIKQDGSEKYYVDSVKG	113	IKQDGSEK	214
	CDR-H3	EDRIAAAGMRELDY	114	AREDRIAAAGMRELD Y	215
A11	CDR-L1	RSSQSLLHSNGYNYLD	115	QSLLHSNGYNY	216
	CDR-L2	LGSNRAS	116	LGS	217
	CDR-L3	MQGTHWPPYT	117	MQGTHWPPYT	117
	CDR-H1	SYAMT	118	GFSFTSYA	218
	CDR-H2	GISSDGTTTTYADSVRG	119	ISSDGTTT	219
	CDR-H3	DQLLGWDALNV	120	ARDQLLGWDALNV	220

En una realización, el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender:

una región variable de cadena ligera que comprende una CDR-L1, una CDR-L2 y una CDR-L3, y

una región variable de cadena pesada que comprende una CDR-H1, una CDR-H2 y una CDR-H3, en el que las CDR son tal como se describieron anteriormente.

Más específicamente, el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender:

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259 ó 345, y

una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258 ó 260.

En una realización específica, combinaciones de una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que pueden estar comprendidas en el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en esta divulgación se ilustran en la tabla 2:

5

Tabla 2

	región variable	Secuencia de aminoácidos (N→C)	SEQ ID NO
E3	región variable de cadena ligera	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRFYASWYQQKSGQAP VLVMYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYC NSRDSSGSHLTGVFGGGTKVTVLGQPAAA	221
	región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMISL RAEDTAVYYCARDTYYYGSGRSNAFDIWGQGTLTVSS	222
B3	región variable de cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC QQYDNLPFGGGTKVDIKRTAAA	223
	región variable de cadena pesada	EVQLLES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSG SIGYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGDSSGWSDAFDIWGQGTMTVTVSS	224
A10	región variable de cadena ligera	DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQ QYGSSPRMYTFGQGTKVDIKRTAAA	225
	región variable de cadena pesada	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSY AISWVRQAPG QGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADKSISTAYMELSSLR S EDTAVYYCARGGLGELDNWFDWPWGQGT LTVTVSS	226
G1	región variable de cadena ligera	SYELTQPPSLSVSPGQTASITCSGYKLGD RYVSWYQQKTGQSP VVVIYKDSQRPSGVPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSGTGVFGGGTKLTVLGQPAAA	227
	región variable de cadena pesada	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYGISWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYAQELQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARVGVAGKLDYW GQGTLTVTVSS	228
G9	región variable de cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNYVSWYQQHPG KAPKLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGN MASLTISGLQAEDEAD YYCSSYTGSSSTLDVLFGGGTKLTVLGQPAAA	233
	región variable de cadena pesada	QVQLVQPGA EVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGT LTVTVSS	234
H2	región variable de cadena	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL RNYASWYQQKPGQAPI LVISGNNKRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTISGAQAEDEADYYCN	235

	ligera	SLDSTYNHPIFGGGTKVTVLGQPAAA	
	región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDIHWVRQATGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCARDGGDAFDIWGQGTLTVTVSS	236
H11	región variable de cadena ligera	SYELTQDPAASVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAP VVVIYGRNNRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTITGAQAEDEADYYC KSRDSSGNHYVFGTGKTLTVLGQPAAA	231
	región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPG QGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARDAGSSSDYWGRGTLTVTVSS	232
F12	región variable de cadena ligera	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDIGDYDVSWYQQHPG KTPKLMYDVSRRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEAD YYCASYTSSSVVVFGGGKTLTVLGQPAAA	237
	región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGIIPGDS TRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGTLTVTVSS	238
B9	región variable de cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQISRYLNWYQQKPGKAP KLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYHCQ QAYGFPLTLGGGKVEIKRTAAA	229
	región variable de cadena pesada	QVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGEIAVAQNWDYYGMDVWGQGTLTVTVSS	230
G11	región variable de cadena ligera	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHP GKAPKLMYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSYSSSSTLVVFGGGKTLTVLGQPAAA	239
	región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGIIPGDS TRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGTLTVTVSS	240
G6	región variable de cadena ligera	SYELTQDPAVSVALGQTVTITCQGDSLRRYYATWYQQKPGQAP VLVIYGQNYRPSGIPDRFSGSNSGTTASLTITGAQAEDEADYYCN SRDSSGNHVVFGGGKTLTVLGQPAAA	241
	región variable de cadena pesada	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPG QGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARGWGYSSSFQYWGQGTTTVTVSS	242
F11	región variable de cadena ligera	QSVLTQPPSTSGTPGQTFSIFCSGSSSNIGTNTVNWYQQLPGTA PKLLIYSNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYY CETWDDSLKGPVFGGGTKVTVLGQPAAA	243
	región variable de cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRRAPG KGLEWVSTISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNNL RAEDTAVYYCAREWELGDAFDIWGRGTLTVTVSS	244
D3	región variable de cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTRWTFGQGKVEIKRTAAA	245

	región variable de cadena pesada	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKDRGSYGYGYGMDVWGQGTMVTVSS	246
B12	región variable de cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTLRFTFGQGTKVEIKRTAAA	247
	región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAPG QGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSED TAVYYCTRAGASIVGATALDYWGQGGLTVTVSS	248
E4	región variable de cadena ligera	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGS SPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEAD YYCQSYDTGNRNYVFGTGTQLTVLGQPAAP	249
	región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYTISWVRQAPG QGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTRDMSTDTAYMELSSL TYDDTAVYFCVRGPSLNYAGYFDNWGQGGLTVTVSS	250
E12	región variable de cadena ligera	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYASWYQQKSGQAP VLVIYGKEKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGARAED EADYYCN SRGSTTDYMFVGGGTQLTVLGQPAAP	251
	región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARERGS GMDVWGQGGLTVTVSS	252
D1	región variable de cadena ligera	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQKPGEA AISIIQEASTLVP GIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCLQ HDKFPYTFGQGTKLEIKRTAAA	253
	región variable de cadena pesada	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL SRL RSDDTAVYYCASRGVDEGDYWGQGGMVTVSS	254
E6	región variable de cadena ligera	NFMLTQPHSVSESPGKVTLSCTGSSGNIASNYVQWYQHRPGS APTTVIYRDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLRPEDEAD YYCQSYDSSSWVFGGGTKLTVLGQPAAP	255
	región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYDITWVRQAPGQ GLEWMGWMNPNSGNSRSAQKFQGRVSM TSDSSISTAYMELS SLRSED TAVYYCATGDYSGVLTATALDYWGQGGLTVTVSS	256
E9	región variable de cadena ligera	QSELTQLPSASETPGQRTISCSGSSSNIGNNYVYWYQQLPGT APKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVLGQPAAP	257
	región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAREDRIAAAGMRELDYWGQGGLTVTVSS	258
A11	región variable de cadena ligera	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQK PGQSPQLLIYLG SNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCMQGTHWPPYTFGQGTKVEIKRTAAA	259
	región variable	EVQLLESGGGLEQPGGFLRLSCAASGFSFTSYAMTWVRQAPG	260

	de cadena pesada	KGLEWVSGISSDGTTTYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMNSL RDEDTAVYYCARDQLLGWDALNVWGQGTMTVTVSS	
E3.1	región variable de cadena ligera	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRFYASWYQQKSGQAP VLVMYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYC NSRDSSGSHLTGVFGGGTKVTVL	345
	región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMISL RAEDTAVYYCARDTYYYGSGRSNAFDIWGQGTTLTVTVSS	222

En esta divulgación, la expresión “un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, CDR, región variable, o cadena pesada /cadena ligera) que comprende, consiste en o representado por una determinada secuencia de aminoácidos” puede referirse a un fragmento de unión a antígeno que consiste esencialmente en (1) la determinada secuencia de aminoácidos o (2) una secuencia de aminoácidos en la que se introduce una mutación insignificante (por ejemplo, sustitución, delección y/o adición de residuo(s) de aminoácido; lo que no tiene ningún impacto sobre la actividad del anticuerpo) en la secuencia de aminoácidos (1).

El anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en esta divulgación puede tener una afinidad de unión (K_D) para LILRB1 (por ejemplo, LILRB1 humano) de 10 mM o menos, 5 mM o menos, 1 mM o menos, 0,5 mM o menos, 0,2 mM o 0,15 mM o menos, por ejemplo, de 0,001 nM a 10 mM, de 0,005 nM a 10 mM, de 0,01 nM a 10 mM, de 0,05 nM a 10 mM, de 0,1 nM a 10 mM, de 0,5 nM a 10 mM, de 1 nM a 10 mM, de 0,001 nM a 5 mM, de 0,005 nM a 5 mM, de 0,01 nM a 5 mM, de 0,05 nM a 5 mM, de 0,1 nM ad 5 mM, de 0,5 nM a 5 mM, de 1 nM a 5 mM, de 0,001 nM a 1 mM, de 0,005 nM a 1 mM, de 0,01 nM a 1 mM, de 0,05 nM a 1 mM, de 0,1 nM a 1 mM, de 0,5 nM a 1 mM, de 1 nM a 1 mM, de 0,001 nM a 0,5 mM, de 0,005 nM a 0,5 mM, de 0,01 nM a 0,5 mM, de 0,05 nM a 0,5 mM, de 0,1 nM a 0,5 mM, de 0,5 nM a 0,5 mM, de 1 nM a 0,5 mM, de 0,001 nM a 0,2 mM, de 0,005 nM a 0,2 mM, de 0,01 nM a 0,2 mM, de 0,05 nM a 0,2 mM, de 0,1 nM a 0,2 mM, de 0,5 nM a 0,2 mM, de 1 nM a 0,2 mM, de 0,001 nM a 0,15 mM, de 0,005 nM a 0,15 mM, de 0,01 nM a 0,15 mM, de 0,05 nM a 0,15 mM, de 0,1 nM a 0,15 mM, de 0,5 nM a 0,15 mM o de 1 nM a 0,15 mM, cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial (RPS).

Otra realización proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como principio activo. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede ser una composición

farmacéutica para tratar y/o prevenir un cáncer. La composición farmacéutica puede tener una actividad para inhibir la unión de LILRB1 a MHC de clase I y/o la interacción entre LILRB1 y MHC de clase I. El cáncer puede ser un cáncer asociado con la interacción entre LILRB1 y MHC de clase I. En una realización, la composición farmacéutica puede tener una actividad para inhibir la evasión inmunitaria de una célula cancerosa. La célula cancerosa puede ser una célula que expresa o sobreexpresa MHC de clase I sobre la superficie celular.

Otra realización proporciona una composición para bloquear la unión de LILRB1 a MHC de clase I y/o la interacción entre LILRB1 y MHC de clase I, comprendiendo la composición el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como principio activo.

Otra realización proporciona una composición para inhibir la evasión inmunitaria de una célula cancerosa, comprendiendo la composición el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como principio activo.

Otra realización proporciona un método de tratar y/o prevenir un cáncer, que comprende administrar (por vía oral o por vía parenteral) una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto (por ejemplo, un mamífero incluyendo un ser humano) que necesita el tratamiento y/o la prevención del cáncer.

Otra realización proporciona un método de bloquear la unión de LILRB1 a MHC de clase I y/o un método de bloquear la interacción entre LILRB1 y MHC de clase I, que comprende administrar (por vía oral o por vía parenteral) una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto (por ejemplo, un mamífero incluyendo un ser humano) que necesita la inhibición de la unión de LILRB1 a MHC de clase I y/o de la interacción entre LILRB1 y MHC de clase I.

Otra realización proporciona un método de inhibir la evasión inmunitaria de una célula cancerosa, que comprende administrar (por vía oral o por vía parenteral) una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto (por ejemplo, un mamífero incluyendo un ser humano) que necesita la inhibición de la evasión inmunitaria de la célula cancerosa.

Los métodos proporcionados en esta divulgación pueden comprender además una etapa de identificar al sujeto que necesita el tratamiento y/o la prevención del cáncer, inhibición de la unión de LILRB1 a MHC de clase I y/o de la interacción entre LILRB1 y MHC de clase I, y/o inhibición de la evasión inmunitaria de la célula cancerosa, antes de la etapa de administración.

Otra realización proporciona una molécula de ácido nucleico (polinucleótido) que codifica para al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, una combinación de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, o una combinación de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3), una región variable de cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, una región variable de cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3; una cadena ligera que comprende la región variable de cadena ligera, y una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada, del anticuerpo anti-LILRB1 descrito anteriormente.

Otra realización proporciona un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico. En una realización, el vector recombinante puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena ligera o cadena ligera, y una molécula de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena pesada o cadena pesada, respectivamente (por ejemplo, en dos vectores independientes) o todas juntas (por ejemplo, en un vector). El vector recombinante puede usarse como vector de expresión.

Otra realización proporciona una célula recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector recombinante.

Otra realización proporciona un método de preparar un anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende expresar la molécula de ácido nucleico en una célula. La etapa de expresar la molécula de ácido nucleico puede comprender cultivar la célula recombinante.

Tal como se describe en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-LILRB1 puede referirse a un fragmento que se deriva de un anticuerpo anti-LILRB1 y retiene la afinidad de unión a antígeno (LILRB1) del anticuerpo. En una realización, el fragmento de unión a antígeno puede ser un

polipéptido que comprende las 6 CDR de un anticuerpo anti-LILRB1 tal como se describió anteriormente y, por ejemplo, puede ser scFv, scFv-Fc, scFv-Ck (región constante kappa), scFv-Cλ (región constante lambda), (scFv)₂, Fab, Fab' o un F(ab')₂, pero no se limita a los mismos. En una realización, el fragmento de unión a antígeno poder ser scFv, un polipéptido de fusión (scFv-Fc) en el que scFv está fusionado con una región de Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, etc.), o un polipéptido de fusión (scFv-Ck o scFv-Cλ) en el que scFv está fusionado con una región constante (por ejemplo, kappa o lambda) de una cadena ligera.

El anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener una actividad reguladora, por ejemplo, una actividad antagonista o agonista, con respecto a la proteína LILRB1. Además, el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener una actividad para bloquear la unión de LILRB1 a MHC de clase I y/o la interacción entre LILRB1 y MHC de clase I. Además, el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener una actividad de inhibición de la evasión inmunitaria de una célula cancerosa. Además, el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener un efecto anticancerígeno.

Una proteína LILRB1, que es un antígeno de un anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en esta divulgación, puede derivarse de un mamífero. Por ejemplo, LILRB1 como antígeno puede ser un LILRB1 humano (por ejemplo, números de acceso de GenBank AAH15731.1 (SEQ ID NO: 348), NP_001265328.2, NP_001265327.2, NP_001075108.2, NP_001075107.2, NP_001075106.2, NP_006660.4, NM_001081637.2, NM_001081638.3, NM_001081639.3, NM_001278398.2, NM_001278399.2, etc.), pero no se limita a los mismos.

MHC de clase I puede ser una de las clases de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En una realización, el MHC de clase I puede ser un MHC de clase I humano y puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en HLA (antígeno leucocitario humano)-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G, pero no se limita a los mismos.

Tal como se describe en el presente documento, el término “anticuerpo” puede referirse a una proteína que se une específicamente a un antígeno específico, y puede ser una proteína producida por estimulación de un antígeno en el sistema inmunitario, o una proteína producida mediante síntesis química o producción recombinante, sin limitación específica. El anticuerpo puede producirse de manera no natural, por ejemplo, producirse mediante producción recombinante o de síntesis. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de animal (por ejemplo, un anticuerpo de ratón, etc.), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

En el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en el presente documento, la porción, excepto para las porciones CDR de cadena pesada y CDR de cadena ligera o las regiones variables de cadena pesada y variables de cadena ligera tal como se definieron anteriormente, puede derivarse de cualquier subtipo de inmunoglobulina (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, y similar), y, por ejemplo, derivarse de las porciones de la región de marco, y/o región constante de cadena ligera y/o región constante de cadena pesada. En una realización, el anticuerpo anti-LILRB1 proporcionado en esta divulgación puede ser un anticuerpo en forma de IgG humana, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, pero sin limitarse a las mismas.

Un anticuerpo intacto (por ejemplo, tipo IgG) tiene una estructura con dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa, en la que cada cadena ligera está unida a una cadena pesada correspondiente a través de un enlace disulfuro. La región constante de un anticuerpo se divide en una región constante de cadena pesada y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena pesada es de tipo gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) o épsilon (ϵ), y tiene gamma 1 (γ 1), gamma 2 (γ 2), gamma 3 (γ 3), gamma 4 (γ 4), alfa 1 (α 1) o alfa 2 (α 2) como su subclase. La región constante de cadena ligera es de tipo kappa (κ) o lambda (λ).

Tal como se usa en el presente documento, el término “cadena pesada” puede estar destinado a abarcar cadenas pesadas de longitud completa y fragmentos de las mismas, en la que la cadena pesada de longitud completa puede comprender una región variable VH que incluye secuencias de aminoácidos suficientes para proporcionar especificidad para antígenos, tres regiones constantes CH1, CH2 y CH3, y

una bisagra. El término “cadena ligera” puede estar destinado a abarcar cadenas ligeras de longitud completa y fragmentos de las mismas, en la que la cadena ligera de longitud completa puede comprender una región variable VL que incluye secuencias de aminoácidos suficientes para proporcionar especificidad para antígenos, y una región constante CL.

El término “región determinante de complementariedad (CDR)” puede referirse a una porción que confiere especificidad de unión a antígeno en una región variable de un anticuerpo, y puede referirse a una secuencia de aminoácidos hallada en una región hipervariable de una cadena pesada o una cadena ligera de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas y ligeras pueden incluir respectivamente tres CDR (CDRH1, CDRH2 y CDRH3; y CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La CDR puede proporcionar residuos de contacto que desempeñan un importante papel en la unión de un anticuerpo a su antígeno o a un epítipo del antígeno. Tal como se usa en el presente documento, los términos “que se une específicamente” y “que reconoce específicamente” pueden tener el mismo significado general tal como lo conoce un experto habitual en la técnica, e indican que un anticuerpo y un antígeno interactúan específicamente entre sí para provocar una reacción inmunológica.

En esta divulgación, a menos que se indique de manera diferente, el término “anticuerpo” puede abarcar no sólo un anticuerpo intacto, sino también un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que posee una capacidad de unión a antígeno.

El término “fragmento de unión a antígeno” usado en el presente documento puede referirse a un polipéptido de cualquier tipo, que comprende una porción (por ejemplo, 6 CDR tal como se describe en el presente documento) que puede unirse a un antígeno, y, por ejemplo, puede ser scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab’ o F(ab’)₂, pero sin limitarse a los mismos. Además, tal como se describió anteriormente, el fragmento de unión a antígeno puede ser scFv, un polipéptido de fusión en el que scFv está fusionado con una región de Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, etc.) o una región constante (por ejemplo, kappa o lambda).

Entre los fragmentos de unión a antígeno, Fab incluye regiones variables de cadena ligera y cadena pesada, una región constante de cadena ligera, y una primera región constante de cadena pesada CH1.

Fab' es diferente de Fab en que Fab' comprende una región bisagra que tiene al menos un residuo de cisteína en el extremo C-terminal de CH1.

5 El anticuerpo F(ab')₂ se forma a través de la formación de puentes disulfuro de los residuos de cisteína en la región bisagra de Fab'.

10 Fv es un fragmento de anticuerpo mínimo que se compone de sólo una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. Las técnicas de recombinación de generación de un fragmento Fv se conocen ampliamente en la técnica.

Fv de dos cadenas comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están unidas entre sí mediante un enlace no covalente. Fv de cadena sencilla comprende generalmente una región variable de
15 cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están unidas entre sí mediante un enlace covalente a través de un ligador peptídico o unidas directamente a los extremos C-terminales para tener una estructura dimérica similar a Fv de dos cadenas.

20 Los fragmentos de unión a antígeno pueden obtenerse usando proteasa (por ejemplo, Fab puede obtenerse escindiendo de manera restrictiva un anticuerpo completo con papaína, y un fragmento F(ab')₂ puede obtenerse escindiendo con pepsina), o pueden prepararse usando una técnica de recombinación genética.

25 El término "región bisagra" puede referirse a una región entre dominios CH1 y CH2 dentro de la cadena pesada de un anticuerpo, que funciona para proporcionar flexibilidad para el sitio de unión a antígeno en el anticuerpo.

30 El anticuerpo anti-LILRB1 puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal y, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal puede prepararse usando un método conocido ampliamente en la técnica, por ejemplo, usando una técnica de exposición en fago. Alternativamente, el anticuerpo anti-LILRB1 puede construirse en forma de un anticuerpo monoclonal derivado de ratón mediante un método convencional.

35

Mientras tanto, pueden seleccionarse anticuerpos monoclonales individuales

usando un formato de ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) típico, basándose en el potencial de unión a LILRB1. Pueden verificarse las actividades inhibitoras a través de análisis funcional tales como ELISA competitivo para verificar la interacción molecular de conjuntos de unión o el análisis funcional tal como un ensayo basado en células. Luego, con respecto a los miembros de anticuerpos monoclonales seleccionados basándose en sus fuertes actividades inhibitoras, pueden verificarse cada una de sus afinidades (valores de Kd) para LILRB1.

La composición farmacéutica puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable, además del principio activo (el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo). El portador farmacéuticamente aceptable puede ser cualquiera seleccionado de los usados habitualmente para la formulación de anticuerpos. Por ejemplo, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, benzoato de metilhidroxilo, benzoato de propilhidroxilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, y similares, pero sin limitarse a los mismos. La composición farmacéutica puede comprender además uno o más seleccionados del grupo que consiste en un diluyente, un excipiente, un lubricante, un agente humectante, un edulcorante, un potenciador del sabor, un agente emulsionante, un agente de suspensión, conservante, y similares, que pueden usarse habitualmente para fabricar la composición farmacéutica.

La composición farmacéutica, o el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, puede administrarse por vía oral o por vía parenteral en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La administración parenteral puede ser inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección muscular, inyección intraperitoneal, administración endotelial, administración intranasal, administración intrapulmonar, administración rectal o administración local intralesional. Debido a que las proteínas o los péptidos se digieren cuando se administran por vía oral, el principio activo en las composiciones para administración oral puede recubrirse o formularse para impedir la digestión en el estómago. Además, el anticuerpo o las composiciones pueden administrarse usando un dispositivo opcional que permite que el principio activo se suministre a las células diana (por ejemplo, células cancerosas).

El anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede estar comprendido en la composición farmacéutica o administrarse a un sujeto en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad farmacéuticamente eficaz” puede referirse a una cantidad de un principio activo (el anticuerpo o fragmento del mismo) a la que el principio activo puede ejercer los efectos deseados (por ejemplo, efecto anticancerígeno). La cantidad farmacéuticamente eficaz puede prescribirse en una variedad de maneras, dependiendo de diversos factores, tales como edad, peso corporal, sexo, estados patológicos, dietas, velocidad de excreción y/o sensibilidad a la reacción de un sujeto, tipos de formulación, momento de administración, intervalo de administración, vía de administración, manera de administración, y similares. Por ejemplo, puede administrarse un anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo a la cantidad de 0,005 ug/kg a 1000 mg/kg, de 0,005 ug/kg a 500 mg/kg, de 0,005 ug/kg a 250 mg/kg, de 0,005 ug/kg a 100 mg/kg, de 0,005 ug/kg a 75 mg/kg, de 0,005 ug/kg a 50 mg/kg, de 0,01 ug/kg a 1000 mg/kg, de 0,01 ug/kg a 500 mg/kg, de 0,01 ug/kg a 250 mg/kg, de 0,01 ug/kg a 100 mg/kg, de 0,01 ug/kg a 75 mg/kg, de 0,01 ug/kg a 50 mg/kg, de 0,05 ug/kg a 1000 mg/kg, de 0,05 ug/kg a 500 mg/kg, de 0,05 ug/kg a 250 mg/kg, de 0,05 ug/kg a 100 mg/kg, de 0,05 ug/kg a 75 mg/kg, o de 0,05 ug/kg a 50 mg/kg por día, pero sin limitarse a las mismas. La dosificación diaria puede formularse en una única formulación en una forma de dosificación unitaria o formularse en formas de dosificación divididas de manera adecuada, o puede fabricarse para estar contenida en un recipiente de dosificación múltiple.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de disolución en aceite o un medio acuoso, una suspensión, un jarabe, una disolución emulsionante, un extracto, un polvo, gránulos, un comprimido o una cápsula, y pueden comprender además un agente de dispersión o estabilizante para la formulación.

El sujeto, al que se aplica el anticuerpo, la composición farmacéutica, o método proporcionado en esta divulgación, puede seleccionarse de mamíferos incluyendo un mamífero que incluye primates tales como seres humanos y simios, roedores tales como ratas y ratones, y similares.

El cáncer puede ser un cáncer sólido o un cáncer hematológico. El cáncer puede ser, pero no se limita a, uno o más seleccionados del grupo que consiste en cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de células escamosas del pulmón,

carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma no microcítico de pulmón, adenocarcinoma del pulmón), carcinoma peritoneal, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, melanoma en la piel o el globo ocular, cáncer rectal, cáncer cerca del ano, cáncer de esófago, tumor de intestino delgado, cáncer de glándulas endocrinas, cáncer paratiroideo, cáncer de glándulas suprarrenales, sarcoma de partes blandas, cáncer de uretra, leucemia (por ejemplo, leucemia crónica o aguda), linfoma linfocítico, hepatoma, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, adenoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de intestino grueso, carcinoma de endometrio o carcinoma de útero, tumor de glándulas salivales, carcinoma de células renales, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vías biliares, cáncer de vesícula biliar, osteosarcoma óseo, y similares. El cáncer puede ser un cáncer primario o un cáncer metastásico. El cáncer puede ser un cáncer caracterizado por la expresión o sobreexpresión de MHC de clase I en una superficie de una célula cancerosa, y, por ejemplo, puede ser adenocarcinoma de colon, carcinoma microcítico de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, melanoma maligno, osteosarcoma óseo, carcinoma de células renales o cáncer de estómago. La sobreexpresión de MHC de clase I puede referirse a una sobreexpresión en comparación con la de una célula normal o una célula cancerosa que no es sensible o es resistente a la inmunoterapia, por ejemplo, inmunoterapia mediada por células T (por ejemplo, células T citotóxicas).

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento de cáncer” puede referirse a todas las acciones anticancerígenas que previenen, alivian o mejoran los síntomas del cáncer, o eliminan parcial o completamente un cáncer, tal como, muerte de células cancerosas, inhibición de la proliferación de células cancerosas, inhibición de metástasis del cáncer, y similares.

El anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en esta divulgación puede administrarse conjuntamente con otro fármaco, por ejemplo, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agentes usados convencionalmente para inmunoterapia, agentes anticancerígenos, agentes citotóxicos, y similares. Por consiguiente, una realización proporciona una composición farmacéutica de administración combinada para tratar y/o prevenir un cáncer, que comprende (1) un anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y (2) al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agentes para

inmunoterapia, agentes anticancerígenos, agentes citotóxicos, y similares. Otra realización proporciona un método de tratar y/o prevenir un cáncer, que comprende administrar (1) un anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y (2) al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agentes para
5 inmunoterapia, agentes anticancerígenos, agentes citotóxicos, y similares, a un sujeto que necesita el tratamiento y/o la prevención del cáncer. Los agentes para inmunoterapia, agentes anticancerígenos y agentes citotóxicos pueden incluir cualquier fármaco que se use de manera convencional para la terapia contra el cáncer, y/o tenga actividad citotóxica y, por ejemplo, pueden ser al menos uno seleccionado del grupo
10 que consiste en proteínas tales como anticuerpos, moléculas de ácido nucleico tales como ARNip, y/o compuestos químicos de molécula pequeña tales como paclitaxel, docetaxel, y similares, pero sin limitarse a los mismos.

Otra realización proporciona una molécula de polipéptido que comprende una
15 región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, o una combinación de las mismas), una región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, o una combinación de las mismas), una combinación de las mismas; o una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, o una combinación de las mismas, del
20 anticuerpo anti-LILRB1 tal como se describió anteriormente. La molécula de polipéptido puede usarse en la preparación de un anticuerpo como precursor de anticuerpo, o puede estar comprendida en un armazón proteínico que tiene una estructura de tipo anticuerpo (por ejemplo, peptidocuerpo), un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico, como componente de la misma. En otra realización, la molécula de
25 polipéptido puede usarse como dominio de reconocimiento de diana (antígeno) o un anticuerpo secretado, en terapias celulares para la terapia dirigida, tal como CAR-T. En otra realización, la molécula de polipéptido puede usarse para construir células que secretan anticuerpos anti-LILRB1 como terapias celulares.

30 Otra realización proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para una región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, o una combinación de las mismas), una región variable de cadena pesada, o una cadena pesada, del anticuerpo anti-LILRB1.

35 Otra realización proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para una región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2,

CDR-L3, o una combinación de las mismas), una región variable de cadena ligera, o una cadena ligera, del anticuerpo anti-LILRB1.

Otra realización proporciona un vector recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena pesada o una cadena pesada del anticuerpo anti-LILRB1, y una región variable de cadena ligera o una cadena ligera del anticuerpo anti-LILRB1, respectivamente, en dos vectores independientes o todas juntas en un vector.

Otra realización proporciona una célula recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector recombinante.

El término “vector” se refiere a un medio para expresar un gen diana en una célula huésped, tal como se ejemplifica mediante un vector plasmídico, un vector de cósmido, y un vector viral tal como un vector de bacteriófago, un vector de lentivirus, un vector de adenovirus, un vector de retrovirus y un vector de virus adenoasociado. El vector recombinante puede construirse a partir de o mediante la manipulación de un plásmido (por ejemplo, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, serie pGEX, serie pET, pUC19, etc.), un fago (por ejemplo, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ z1, M13, etc.), o un vector virus (por ejemplo, SV40, etc.), que se usa habitualmente en la técnica.

En el vector recombinante, la molécula de ácido nucleico puede estar unida de manera operativa a un promotor. Se pretende que el término “unido de manera operativa” corresponda a una unión funcional entre una secuencia de nucleótidos de interés y una secuencia reguladora de expresión (por ejemplo, una secuencia promotora). Al estar “unido de manera operativa”, el elemento regulador puede controlar la transcripción y/o traducción de un polinucleótido de interés.

El vector recombinante puede construirse normalmente como vector de clonación o vector de expresión. Para vectores de expresión recombinantes, puede emplearse un vector disponible generalmente en la técnica relevante para expresar una proteína ajena en células vegetales, animales o microbianas. Pueden usarse diversos métodos bien conocidos en la técnica para la construcción de vectores recombinantes.

Puede construirse el vector recombinante por consiguiente para su uso en huéspedes, tales como células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, cuando se construye un vector como vector de expresión para su uso en un huésped procariota, el vector incluye normalmente un promotor fuerte para la transcripción (por ejemplo, un promotor de pL^λ, un promotor de CMV, un promotor de *trp*, un promotor de *lac*, un promotor de *tac*, un promotor de T7, etc.), un sitio de unión ribosómico para iniciar la traducción y secuencias de terminación transcripcionales/traduccionales. Por otro lado, un vector de expresión para su uso en un huésped eucariota incluye un origen de replicación que puede funcionar en una célula eucariota, tal como un origen de replicación de f1, un origen de replicación de SV40, un origen de replicación de pMB1, un origen de replicación de adenovirus, un origen de replicación de VAA y un origen de replicación de BBV, pero no se limita a los mismos. Además, el vector de expresión incluye normalmente un promotor derivado de genomas de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, promotor tardío de adenovirus, promotor de 7,5 K de virus vaccinia, promotor de SV40, promotor de citomegalovirus, promotor de *tk* de VHS, etc.), y una secuencia de poliadenilación como secuencia de terminación de transcripción.

La célula recombinante puede prepararse introduciendo el vector recombinante en una célula huésped adecuada. Siempre que permita la expresión y clonación secuenciales del vector recombinante de una manera estable, puede emplearse en la presente divulgación cualquier célula huésped conocida en la técnica. Los ejemplos de la célula huésped procariota disponible para la presente divulgación pueden seleccionarse de *E. coli* tal como *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, *Bacillus spp.* tal como *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*, y cepas de *Enterobacteriaceae* tales como *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y diversas especies de *Pseudomonas*. Las células huésped eucariotas que pueden usarse para la transformación pueden seleccionarse de, pero sin limitarse a, *Saccharomyces cerevisiae*, células de insectos y células animales, tales como Sp2/0, CHO (ovario de hámster chino) K1, CHO DG44, CHO S, CHO DXB11, CHO GS-KO, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK, etc.

La molécula de ácido nucleico o un vector recombinante que porta la misma puede introducirse (transfectarse) en una célula huésped usando un método bien conocido en la técnica relevante. Por ejemplo, esta transfección puede llevarse cabo usando un método de electroporación o CaCl₂ cuando la célula huésped es procariota.

Para células huésped eucariotas, la introducción genética puede lograrse usando, pero sin limitarse a, microinyección, precipitación con fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por liposomas o bombardeo con partículas.

Para seleccionar una célula huésped transformada, puede aprovecharse un fenotipo asociado con un marcador de selección según métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando el marcador de selección es un gen que confiere resistencia a un determinado antibiótico, las células huésped pueden hacerse crecer en presencia del antibiótico en un medio para seleccionar un transformante de interés.

Otra realización proporciona un método de preparar el anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende expresar la molécula de ácido nucleico o un vector recombinante en una célula huésped. La etapa de expresión puede realizarse cultivando la célula recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, en un vector recombinante) en condiciones que permitan la expresión de la molécula de ácido nucleico. El método puede comprender además aislar y/o purificar el anticuerpo o su fragmento a partir del cultivo celular, después de la etapa de expresión o cultivo.

Efectos ventajosos

El anticuerpo anti-LILRB1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en esta divulgación puede tener un efecto anticancerígeno alto mediante la inhibición del mecanismo de evasión inmunitaria de las células cancerosas, lo que permite que las células inmunitarias puedan presentar su efecto anticancerígeno.

Descripción de los dibujos

La figura 1 es una imagen de electroforesis que muestra los resultados del análisis del gel de SDS-PAGE para anticuerpos anti-LILRB1 purificados en un ejemplo.

La figura 2 es un sensorgrama que muestra los resultados del ensayo de RPS (resonancia de plasmón superficial) para el anticuerpo anti-LILRB1 B3 según un ejemplo.

La figura 3 es un sensorgrama que muestra los resultados del ensayo de RPS

para un anticuerpo anti-LILRB1 E3 según un ejemplo.

La figura 4a es un gráfico que muestra la capacidad de unión de anticuerpo anti-LILRB1 A10 según un ejemplo a un linfocito citolítico natural humano, KHYG-1; la figura 4b es un gráfico que muestra la capacidad de unión del anticuerpo anti-LILRB1 E3 según un ejemplo a un linfocito citolítico natural humano, KHYG-1; y la figura 4c es un gráfico que muestra la capacidad de unión de un anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano a un linfocito citolítico natural humano, KHYG-1.

La figura 5 es un gráfico que muestra el nivel de unión de proteínas LILRB1-Fc recombinantes a la superficie celular que sobreexpresa HLA-G medido mediante un dispositivo iQue screener, cuando se trata con anticuerpos anti-LILRB1 según un ejemplo y anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano, respectivamente.

La figura 6 es un gráfico que muestra los efectos antitumorales *in vivo* de anticuerpos anti-LILRB1 E3 y B3 según un ejemplo.

Las figuras 7a a 7d son diagramas de citometría de flujo de la unión del anticuerpo anti-LILRB1 E3.1 según un ejemplo a células que expresan diversos miembros de la familia de LILR humano.

Las figuras 8a a 8d son diagramas de citometría de flujo de la unión del anticuerpo anti-LILRB1 H11 según un ejemplo a células que expresan diversos miembros de la familia de LILR humano.

La figura 9 es un gráfico que muestra el nivel de liberación de granzima B en un linfocito citolítico natural humano, KHYG-1, cuando se trata con un anticuerpo anti-LILRB1 E3.1 o H11 según un ejemplo, en comparación con el de la célula tratada con un anticuerpo de control (isotipo IgG4 humano).

La figura 10 es un gráfico que muestra el nivel de liberación de perforina en un linfocito citolítico natural humano, KHYG-1, cuando se trata con un anticuerpo anti-LILRB1 E3.1 o H11 según un ejemplo, en comparación con el de la célula tratada con un anticuerpo de control (isotipo IgG4 humano).

La figura 11 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de indicador de

luciferasa para evaluar la capacidad del anticuerpo anti-LILRB1 E3.1 o H11 según un ejemplo para bloquear la ruta de señales de LILRB1.

La figura 12 es un gráfico que muestra los efectos antitumorales *in vivo* de anticuerpos anti-LILRB1 E3.1 y H11 según un ejemplo.

Modo para la invención

A continuación, en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle mediante los ejemplos.

Se pretende que los siguientes ejemplos illustren simplemente la invención y no se interpreta que restrinjan la invención.

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos humanos contra LILRB1

1.1. Selección de anticuerpos humanos contra LILRB1 usando exposición en fago

Para seleccionar anticuerpos que reconozcan específicamente LILRB1 humano, se realizó un cribado de exposición en fago usando una biblioteca compuesta por anticuerpos scFv humanos. Como antígeno, se usaron respectivamente LILRB1 humano-His (n.º de cat. 8989-T2) y LILRB1 humano-Fc (n.º de cat. 2017-T2) (RnD systems). Se conjugó cada antígeno con biotina mediante el kit de sulfo-NHS-biotina EZ-Link (ThermoFisher Scientific) para su uso.

Se realizó el cribado de exposición en fago usando 4 tipos totales de antígenos LILRB1 (LILRB1-His, LILRB1-Fc, LILRB1-His-biotina y LILRB1-Fc-biotina) a través de cribado en fase sólida y cribado en fase de disolución. Se realizaron cribados adicionales disminuyendo de manera gradual la concentración del antígeno usado, eluyendo de manera competitiva con anticuerpos de control contra LILRB1, realizando una selección negativa para Fc cuando se usa LILRB1-Fc como antígeno, etc. Se confirmaron los productos seleccionados por su unión al antígeno a través de ELISA de fagos policlonales.

1.2. Cribado y análisis de scFv monoclonales solubles

Se amplificaron mediante PCR los genes que codifican para los scFv, que se verificó que se unían al antígeno del ejemplo 1.1, para preparar vectores de expresión.

Para cada selección, se transfirió un determinado número de transformantes a una placa de cultivo de 96 pocillos para el cribado. Se expresaron los anticuerpos en forma de scFv usando medios de autoinducción (Studier, F.W. (2005) Protein Expression and Purification 41, 207-34) y luego se analizaron para determinar su unión al antígeno realizando un inmunoensayo DELFIA (PerkinElmer). Además, después de permitir que se capturara una determinada cantidad de cada anticuerpo scFv en la superficie, se realizó DELFIA para el antígeno para determinar la clasificación para la afinidad de unión antígeno-anticuerpo.

1.3. Conversión de los scFv cribados en anticuerpos IgG

Entre los clones que se confirmaron que se unían al antígeno del ejemplo 1.2, se seleccionaron un total de 376 clones, y se analizaron las secuencias de ADN de los genes que codifican para los scFv seleccionados mediante una secuenciación de ADN general para eliminar los clones duplicados. Además, se seleccionaron un total de 93 clones basándose en la clasificación de la afinidad de unión antígeno-anticuerpo determinada en el ejemplo 1.2. Se amplificaron respectivamente mediante PCR los genes que codifican para una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) a partir de cada uno de los genes que codifican para los scFv seleccionados, y se insertaron en un vector de expresión (pTRIOZ-hIgG4, InvivoGen; alternatively, puede usarse uno cualquiera de los vectores que comprenden un promotor de CMV o un promotor de fusión de beta-actina de CMV/CHO (KR10-1038126B1) y genes que codifican para la región constante de cadena pesada y la región constante de cadena ligera kappa o lambda de IgG4 humana), en los que el vector de expresión se diseñó para codificar para un anticuerpo IgG4 humano (Fc de IgG4: SEQ ID NO: 341, región constante kappa: SEQ ID NO: 342, región constante lambda: SEQ ID NO: 343). Se confirmó la secuencia de ADN del vector de expresión mediante secuenciación.

1.4. Preparación de los anticuerpos seleccionados

Se purificaron los vectores construidos en el ejemplo 1.3 usando un kit Plasmid Plus Maxi (Qiagen). Se usaron los vectores purificados para expresar anticuerpos en células ExpiCHO-S™ o células Expi293™.

En particular, se transfectaron los vectores construidos en el ejemplo 1.3 en células ExpiCHO-S™ (Gibco) ($1,5 \times 10^8$ células/volumen de cultivo de 25 ml) añadiendo 80 μ l de reactivo ExpiFectamine™ CHO (Thermo Fisher). Un día tras la transfección, se

añadieron 150 μ l de potenciador ExpiCHO™ (Thermo Fisher) y 4 ml de alimentación ExpiCHO™ (Thermo Fisher) al cultivo. En el día 5, se añadieron 4 ml de alimentación ExpiCHO™ al cultivo. Se cultivaron las células transfectadas en las condiciones de 32°C y el 5% de CO₂ durante 7-11 días en total.

5

Además, se transfectaron los vectores contruidos en el ejemplo 1.3 en células Expi293F™ (Gibco) (3×10^8 células/volumen de cultivo de 100 ml) añadiendo 320 μ l de reactivo ExpiFectamine™ 293 (Gibco) según el protocolo del fabricante. Un día tras la transfección, se añadieron potenciador 1 ExpiFectamine™ 293 (Thermo Fisher),
10 potenciador 2 ExpiFectamine™ (Thermo Fisher) y glucosa en la cantidad de 0,6 ml por volumen de cultivo de 100 ml, 6 ml por volumen de cultivo de 100 ml y 3,6 g por 1 litro, respectivamente. Se cultivaron las células transfectadas en las condiciones de 36,5°C y el 5% de CO₂ durante 5 días en total. Se centrifugaron respectivamente las células cultivadas de dos tipos a 4000 rpm a 4°C durante 20 minutos, y luego se filtraron
15 usando un sistema de filtros para la parte superior de frascos de 0,22 μ m (Corning). Se recogió el sobrenadante de cultivo y se purificó usando un dispositivo AKTA Pure L (GE Healthcare). Se cargo el sobrenadante de cultivo en un dispositivo AKTA Pure L equipado con una columna Hitrap MabSelectSure de 1 ml (GE Healthcare) a una velocidad de flujo de 1 ml/min, y se lavó la columna con 20 volúmenes de columna (VC)
20 de PBS 1X. Luego, se cargó tampón de elución (tampón citrato de sodio 0,1 M, pH 3,4) en la columna para eluir una proteína de interés. Se concentró el eluato usando un dispositivo de filtros Amicon Ultra (MWCO 10K, Merck), se centrifugó y se sometió a intercambio de tampón con tampón PBS 1x.

25 Se diluyeron las muestras de anticuerpo purificado con PBS 1X para obtener una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml. Se mezclaron 10 μ l de tampón de carga reductor (3X) o tampón de carga no reductor (3X) y 20 μ l de la muestra de anticuerpo purificado y se dejaron en un baño de calentamiento a 95°C durante 2 minutos, y luego se sacaron y se enfriaron. Se inyectó la muestra en un gel de gradiente
30 de SDS-PAGE (4-20% o 4-12%) equipado en un dispositivo de electroforesis a la cantidad de 10 μ g por pocillo y se reveló en el gel. Para analizar el peso molecular de la muestra, se inyectaron patrones de Precision Plus Protein™ Dual Color (BIO-RAD) a otro pocillo independiente. Se tiñó el gel con disolución de tinción de Coomassie y se destiñó para obtener imágenes de gel.

35

Entre los 93 anticuerpos, las imágenes de electroforesis en gel para los

anticuerpos A10, B3, E3, G1, G9 y H2 se muestran de manera representativa en la figura 1. Tal como se muestra en la figura 1, se confirmó la producción de anticuerpos que tienen un enlace disulfuro.

1.5. Análisis de afinidad de unión de los anticuerpos seleccionados

Se midieron las afinidades de unión de los 93 anticuerpos, que se seleccionaron en el ejemplo 1.3, al antígeno, LILRB1, usando Biacore T200 (GE healthcare). Se dejó fluir un anticuerpo anti-IgG (Fc) humana (GE healthcare, n.º de cat. BR-1008-39, concentración final de 25 µg/ml) a la velocidad de flujo de 5 µl/min durante 360 segundos para inmovilizarse a 5000-7000 UR en un chip sensor CM5 de la serie S (GE healthcare, n.º de cat. BR-1005-30) usando un kit de acoplamiento de aminas (GE healthcare, n.º de cat. BR-1000-508). Se inyectó al mismo el antígeno, proteína LILRB1 humana (LILRB1-His, RnD systems, n.º de cat. 8989-T2) en 4~9 concentraciones diferentes desde 3,13 nM hasta 1600 nM a la velocidad de flujo de 30 µl/min para determinar los valores de k_a y k_d tal como se muestran en la tabla 3 y calcular el valor de K_D a partir de los mismos.

Entre los 93 anticuerpos, se seleccionaron 20 anticuerpos que mostraban excelentes afinidades de unión (valores de K_D) y se resumen en la tabla 3. Entre ellos, los sensorgramas de RPS para el anticuerpo B3 que muestra la afinidad de unión a LILRB1 (K_D) de aproximadamente 99,8 nM y para el anticuerpo E3 que muestra la afinidad de unión a LILRB1 (K_D) de aproximadamente 101,2 nM se muestran en las figuras 2 y 3, respectivamente (figura 2: sensorgrama de RPS para B3, figura 3: sensorgrama de RPS para E3):

TABLA 3

Afinidades de unión a antígeno (K_D) de anticuerpos anti-LILRB1 para LILRB1 humano

Nombre del clon	k_a (x 10 ⁵) (1/Ms)	k_d (x 10 ⁻⁴) (1/s)	K_D (nM)
A10	0,504	76,5	152
A11	0,001801	9,814	5448
B3	0,149	14,87	99,8
B9	0,09324	6,16	66,1
B12	1,84	14,42	7,84
D1	1,165	57,44	49,33
D3	0,0311	5,58	180
E3	0,3460	35,00	101,2
E4	0,1065	7,73	72,55

E6	0,2679	16,27	60,73
E9	0,105	10,48	99,86
E12	2,331	102,6	44,01
F11	2,72	6,15	2,26
F12	2,811	9,731	3,462
G1	4,33	14,19	3,28
G6	2,58	152,4	59,06
G9	1,43	4,36	3,05
G11	0,454	20,53	45,23
H2	5,865	95	16,20
H11	2,962	22,57	7,621

1.6. Análisis de secuencia de los anticuerpos seleccionados

En los 20 anticuerpos que se analizan para determinar la afinidad de unión a antígeno en el ejemplo 1.5, se analizaron las secuencias de aminoácidos de las CDR definidas según la numeración de Kabat, región variable de cadena ligera, región variable de cadena pesada, cadena ligera y cadena pesada, y secuencia de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada mediante métodos generales de secuenciación de aminoácidos y secuenciación de ADN y se resumen en las tablas 4-23:

TABLA 4

Clon del anticuerpo E3

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QGDSLRFYAS	1
CDR-L2	GKNNRPS	2
CDR-L3	NSRDSSGSHLTGV	3
CDR-H1	SYAMS	4
CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG	5
CDR-H3	DTYYYGSGRSNAFDI	6
región variable de cadena ligera	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRFYASWYQQKSGQAPVLVMYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGSHLTGVFGGGTKVTVLGQPAAA	221
gen que codifica para la región	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAGGGAGACAGCCTCAGAACTTTTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGTCAGGACAGGCCCCAGTTCTTGT CATGTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTC	261

variable de cadena ligera	TCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGG CTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAG CAGTGGTAGCCATTTGACGGGCGTATTCTGGCGGAGGGACCAAGGT CACCGTCCTAGGTCAGCCCCGCGGCCGCA	
región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMISLRAEDTAVYY CARDTYYYGSGRSNAFDIWGQGLTVTVSS	222
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAATACGCTGTATCTGCAAATGATTAGCCTGAGAGCTGAGGACACG GCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATACGTATTACTATGGTTCGGGGAG AAGTAATGCTTTTGATATATGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CGAGT	262
cadena ligera (lambda)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD SLRNFYASWYQQKSGQAPVLVM YGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGS HLTGVFGGGKVTVLGQPAAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	301
cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMISLRAEDTAVYY CARDTYYYGSGRSNAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	302

TABLA 5
Clon del anticuerpo B3

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QASQDISNYLN	7
CDR-L2	DASNLET	8
CDR-L3	QQYDNLP	9
CDR-H1	DYAMH	10
CDR-H2	GISWNSGSIGYADSVKG	11

CDR-H3	VGDSSGWSDAFDI	12
región variable de cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAP KLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQ YDNLPGGGTKVDIKRTAAA	223
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATT AGCAACTATTTGAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTC CCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACT GTCAACAGTATGATAATCTCCCTTTCGGCGGAGGGACCAAAGT GGATATCAAACGTACCGCGGCCGCA	263
región variable de cadena pesada	EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARVGDSSGWSDAFDIWGQGTMTVTVSS	224
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCT GGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCT TTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGC ATAGGCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGTCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTTGGG GATAGCAGTGGCTGGTCCGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAG GGACAATGGTCACCGTCTCGAGT	264
cadena ligera (kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAP KLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQ YDNLPGGGTKVDIKRTAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLT SKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	303
cadena pesada	EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARVGDSSGWSDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK	304

TABLA 6
Clon del anticuerpo A10

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	RASQSVSSNLA	13
CDR-L2	GASTRAT	14
CDR-L3	QQYGSSPRMYT	15
CDR-H1	SYAIS	16
CDR-H2	GIIPFGTANYAQKFQG	17
CDR-H3	GGLGELDNWFDP	18
región variable de cadena ligera	DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPR LLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYG SSPRMYTFGQGTKVDIKRTAA	225
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	GATATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCA GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTA GCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCC CAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACCGGTATCC CAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTG TCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCGGATGTACACTTTTGGCCAGG GGACCAAAGTGGATATCAAACGTACCGCGGCCGCA	265
región variable de cadena pesada	QMQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADKSISTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLGELDNWFDPWGQGTLVTVSS	226
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTT CAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA GGGCTTGAGTGGATGGGTGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGC AAATACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGG ACAATCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCGGCCTCG GGGAGTTGGACAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCT GGTACCGTCTCGAGT	266
cadena ligera (kappa)	DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPR LLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYG SSPRMYTFGQGTKVDIKRTAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS KADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	305
cadena pesada	QMQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADKSISTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGLGELDNWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP	306

	EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	
--	---	--

TABLA 7
Clon del anticuerpo G1

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	SGYKLGDRYVS	19
CDR-L2	KDSQRPS	20
CDR-L3	QAWDSGTGV	21
CDR-H1	SYGIS	22
CDR-H2	WISAYNGNTNYAQELQG	23
CDR-H3	VGvagkldy	24
región variable de cadena ligera	SYELTQPPSLSVSPGQTASITCSGYKLGDRYVSWYQQKTGQSPVV VIYKDSQRPSGVPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSGTGVFGGGTKLTVLGQPAAA	227
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCACTGTCCGTGTCCCCAGG ACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCAGGATATAAACTGGGAGATA GATATGTTTCCTGGTATCAGCAGAAGACAGGCCAGTCCCCTGTG GTGGTCATCTATAAAGATAGCCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGA ACGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCA TCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAG GCGTGGGACAGCGGCACTGGGGTATTCGGCGGAGGGACCAAG CTGACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCGCA	267
región variable de cadena pesada	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQG LEWMGWISAYNGNTNYAQELQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARVGVAGKLDYWGGGTLTVSS	228
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTT CAGCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA GGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACAC AACTATGCACAGGAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAG ACACATCCACGAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGGAGCCTGAGA TCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTAGGGGTGG CTGGTAAACTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTC TCGAGT	268
cadena ligera (lambda)	SYELTQPPSLSVSPGQTASITCSGYKLGDRYVSWYQQKTGQSPVV VIYKDSQRPSGVPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSGTGVFGGGTKLTVLGQPAAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS	307

	DFYPGAVTVAWKEDSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
cadena pesada	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYGISWVRQAPGQG LEWMGWISAYNGNTNYAQELQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARVGVAGKLDYWGGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	308

Tabla 8
Clon del anticuerpo G9

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	TGSSSDVGGYNYVS	25
CDR-L2	DVSNRPS	26
CDR-L3	SSYTGSSSLDVL	27
CDR-H1	SYWIG	28
CDR-H2	IIPGDS DTRYSPSFQG	29
CDR-H3	QYYDGGYYMDV	30
región variable de cadena ligera	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNMA SLTISGLQAEDEADYYCS SYTGSSTLDVLFGGGTKLTVLGQPAAA	233
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	CAGTCTGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTG GACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAAGCAGCAGTGACGTT GGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAGCAACACCCAGGCAAA GCCCCAAACTCATGATTTATGATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGG GTTTCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACATGGCCTC CCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATT ACTGCAGCTCATATACAGGAAGCAGCACTCTCGACGTGCTATTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCC GCA	269
región variable de cadena pesada	QVQLVQPGAIEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCASQYYDGGYYMDVWVGQGLVTVSS	234
gen que codifica para la región	CAGGTGCAGCTGGTGCAGCCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCG GGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTT TACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAG	270

variable de cadena pesada	GGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGA CTCTGATAC CAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCG ACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAA GGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCAATATTACGA TGGGGGTTACTACATGGACGTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCGAGT	
cadena ligera (lambda)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNMA SLTISGLQAEDEADYYCS SYTGSSTLDVLFGGGTKLTVLGQPAAAPSVTLFPPSSEELQANKAT LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	309
cadena pesada	QVQLVQPGAIEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCASQYYDGGYYMDVWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGP PCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	310

TABLA 9
Clon del anticuerpo H2

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QGD SLRNYAS	31
CDR-L2	GNNKRPS	32
CDR-L3	NSLDSTYNHPI	33
CDR-H1	SYDIH	34
CDR-H2	WISAYNGNTNYAQKLQG	35
CDR-H3	DGGDAFDI	36
región variable de cadena ligera	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL RNYASWYQQKPGQAPILVI SGNNKRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTISGAQAEDEADYYCNSLDST YNHPIFGGGTKVTVLGQPAAA	235
gen que codifica para la región variable de	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTGCGGTGGCCTTG G GACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAA CTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTTA TTCTTGT CATCTCTGGTAACAACAAACGGCCCTCGGGGATCCCA	271

cadena ligera	GACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAGACACAGCTTCCTTGAC CATCTCTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTA ACTCCCTAGACAGCACTTATAACCATCCGATATTCGGCGGAGGGA CCAAGGTCACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCGCA	
región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDIHWVRQATGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDD TAVYYCARDGGDAFDIWGQGTLTVSS	236
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTC ACCAGTTATGATATCCACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGG GCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAA ACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGAC ACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATC TGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGGGTGATG CTTTTGATATCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	272
cadena ligera (lambda)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRLNYASWYQQKPGQAPILVI SGNNKRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTISGAQAEDEADYYCNSLDST YNHPIFGGGTKVTVLGQPAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	311
cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDIHWVRQATGQGL EWMGWISAYNGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDD TAVYYCARDGGDAFDIWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK	312

TABLA 10
Clon del anticuerpo H11

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ NO	ID
CDR-L1	QGDSLRSYYAS	37	
CDR-L2	GRNNRPS	38	
CDR-L3	KSRDSSGNHYV	39	
CDR-H1	SYVMH	40	
CDR-H2	IINPSGGSTSYAQKFQG	41	

CDR-H3	DAGSSSDY	42
región variable de cadena ligera	SYELTQDPAASVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAP VVVIYGRNNRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTITGAQAEDEADYYC KSRDSSGNHYVFGTGKLTVLGQPAAA	231
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGCGTCTGTGGCCTTG GGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAG AAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGC CCCTGTAGTTGTCATCTATGGTAGAAACAACCGGCCCTCAGG GATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAGACACAG CTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCT GACTATTACTGTAAGTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATTATG TCTTCGGAAGTGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCC GCGGCCGCA	273
región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPG QGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDVAVYYCARDAGSSSDYWGRGTLTVSS	232
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACAC CTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGG ACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTAGTGGTGG TAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCAT GACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGA GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA GAGATGCCGGCAGCTCGTCCGATTACTGGGGCCGTGGCACC CTGGTCACCGTCTCGAGT	274
cadena ligera (lambda)	SYELTQDPAASVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAP VVVIYGRNNRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTITGAQAEDEADYYC KSRDSSGNHYVFGTGKLTVLGQPAAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	313
cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPG QGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDVAVYYCARDAGSSSDYWGRGTLTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	314

TABLA 11
Clon del anticuerpo F12

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	AGTSSDIGDYDYVS	43
CDR-L2	DVSRRPS	44
CDR-L3	ASYTSSSVVV	45
CDR-H1	SYWIG	46
CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG	47
CDR-H3	QYYDGGYYMDV	48
región variable de cadena ligera	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDIGDYDYVSWYQQHPGKTP KLMIYDVSRRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCAS YTSSSVVVFGGGTKLTVLGQPAAA	237
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTG GACAGTCGATCACCATCTCCTGCGCTGGAACCAGCAGTGACATT GGTGATTATGACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAA GACTCCCAAACATCATGATTTATGATGTCAGTAGGCGGCCCTCAG GGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGC CTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGACTGAGGACGAGGCTGATT ATTACTGCGCCTCATATACAAGCAGCAGCGTCGTGGTCTTCGGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCGCA	275
región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCASQYYDGGYYMDVWGQGTLVTVSS	238
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCG GGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTA CCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGG CCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCA GATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGAC AAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGG CCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCAATATTACGATG GGGGTTACTACATGGACGTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAC CGTCTCGAGT	276
cadena ligera (lambda)	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDIGDYDYVSWYQQHPGKTP KLMIYDVSRRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCAS YTSSSVVVFGGGTKLTVLGQPAAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	315
cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA	316

	MYYCASQYYDGGYYMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	
--	---	--

Tabla 12
Clon del anticuerpo B9

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	RASQISRYLN	49
CDR-L2	GASSLQS	50
CDR-L3	QQAYGFPLT	51
CDR-H1	SYAIS	52
CDR-H2	GIIPFGTANYAQKFQG	53
CDR-H3	GEIAVAQNWDYYGMDV	54
región variable de cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISRYLNWYQQKPGKAPKL LIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYHCQQAY GFPLTLGGGTKVEIKRTAAA	229
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAG CAGGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCAA GCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTACCATTGTCAA CAGGCTTACGGTTTCCCCCTCACTCTCGGCGGAGGGACCAAGG TGGAGATCAAACGTACCGCGGCCGCA	277
región variable de cadena pesada	QVQLVESGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCARGEIAVAQNWDYYGMDVWGQGTLVTVSS	230
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCT TCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA GGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGC AAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGG ACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGAAATAG CAGTGGCTCAAACTGGGACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC	278

	CAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
cadena ligera (kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISRYLNWYQQKPGKAPKL LIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYHCQQAY GFPLTLGGGTKVEIKRTAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	317
cadena pesada	QVQLVESGAIEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAV YYCARGEIAVAQNWDYYGMDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK	318

Tabla 13
Clon del anticuerpo G11

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	TGTSSDVGGYNYVS	55
CDR-L2	DVSKRPS	56
CDR-L3	SSYSSSSTLVV	57
CDR-H1	SYWIG	58
CDR-H2	IIYPGDS DTRYSPSFQG	59
CDR-H3	QYYDGGYYMDV	60
región variable de cadena ligera	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQH PGKAPKLMYDVS KRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSYSSSSTLVVFGGGTKLTVLGQAAA	239
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	CAGTCTGCGCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTC CTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGT GATGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCA CCCAGGCAAAGCCCCCAAACATCATGATTTATGATGTCAGTA AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAA GTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACAATCTCTGGGCTCCAG GCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATTCAAG CAGCAGCACTCTCGTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCGCA	279
región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMP GKGLEWMGIIPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGTLLTVSS	240

gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGC CGGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATA CAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATG CCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTG GTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAG GTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTAT TACTGTGCGAGTCAATATTACGATGGGGGTTACTACATGGA CGTCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT	280
cadena ligera (lambda)	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQH PGKAPKLMYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSYSSSSTLVVFGGGTKLTVLGQPAAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTVA PTECS	319
cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMP GKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYCASQYYDGGYYMDVWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK	320

Tabla 14
Clon del anticuerpo G6

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QGDSLRRYYAT	61
CDR-L2	GQNYRPS	62
CDR-L3	NSRDSSGNHVV	63
CDR-H1	SYVMH	64
CDR-H2	GIPIFGTANYAQKFQG	65
CDR-H3	GWGYSSSFDY	66
región variable de cadena ligera	SYELTQDPAVSVALGQTVTITCQGDSLRRYYATWYQQKPGQAPVLV IYGQNYRPSGIPDRFSGSNSGTTASLTITGAQAED EADYYCNSRDS SGNHVVFGGGTKLTVLGQPAVA	241
gen que	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG	281

codifica para la región variable de cadena ligera	ACAGACAGTCACGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGGT ATTATGCAACCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTCT CTTGTCATCTATGGTCAAACTACCGGCCCTCGGGGATCCCAGA CCGATTCTCTGGCTCCAACTCAGGAACCACAGCTTCCTTGACCA TCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAC TCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGA CCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCGCA	
región variable de cadena pesada	EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGQG LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGWGYSSSFQYWGQGTTVTVSS	242
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTT CACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAG GGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCA AACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGA CGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAT CTGAGGACACGGCCGTGTACTACTGTGCGAGAGGGTGGGGGTA TAGCAGCTCGTTTGACTACTGGGGGCAAGGGACCACGGTCACC GTCTCGAGT	282
cadena ligera (lambda)	SYELTQDPAVSVALGQTVTITCQGDSLRRYYATWYQQKPGQAPVLV IYGQNYRPSGIPDRFSGSNSGTTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDS SGNHVVFVGGTGLTLVGLQPAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTP EQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	321
cadena pesada	EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGQG LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGWGYSSSFQYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK	322

TABLA 15

Clon del anticuerpo F11

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	SGSSSNIGTNTVN	67
CDR-L2	SNDQRPS	68

CDR-L3	ETWDDSLKGPV	69
CDR-H1	SYAMS	70
CDR-H2	TISGSGDSTYYADSVKG	71
CDR-H3	EWELGDAFDI	72
región variable de cadena ligera	QSVLTQPPSTSGTPGQTFSIFCSGSSSNIGTNTVNWYQQLPGT APKLLIYSNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAD YYCETWDDSLKGPVFGGGTKVTVLGQPAAA	243
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAACGTCTGGGACCC CCGGGCAGACGTTCTCCATTTTTTGTCTGGAAGCAGTTTCG AACATCGGAACTAATACTGTTAATTGGTACCAGCAGCTCCCA GGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTAATGATCAGCG GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCT GGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG AGGATGAGGCTGATTATACTGTGAAACATGGGATGACAGC CTGAAAGGCCCGGTGTTCTGGCGGGGGGACCAAGGTCACC GTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCGCA	283
región variable de cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRRAP GKGLEWVSTISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NLRAEDTAVYYCAREWELGDAFDIWGRGTLVTVSS	244
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAG CCTGGGGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGAT TCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCGGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTAGTGGTA GTGGTGATAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG CAAATGAACAACCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGAGAGAATGGGAACTAGGCGATGCTTTTGATATCT GGGGCCGTGGCACCTGGTCACCGTCTCGAGT	284
cadena ligera (lambda)	QSVLTQPPSTSGTPGQTFSIFCSGSSSNIGTNTVNWYQQLPGT APKLLIYSNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAD YYCETWDDSLKGPVFGGGTKVTVLGQPAAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT ECS	323
cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRRAP GKGLEWVSTISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NLRAEDTAVYYCAREWELGDAFDIWGRGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	324

	ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
--	--	--

TABLA 16
Clon del anticuerpo D3

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	RASQSISSYLN	73
CDR-L2	AASSLQS	74
CDR-L3	QQSYSTRWT	75
CDR-H1	SYAMS	76
CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG	77
CDR-H3	DRGSYGYYYGMDV	78
región variable de cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS TRWTFGQGTKVEIKRTAAA	245
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAG CAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAA CAGAGTTACAGTACCCGGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGG TGGAATCAAACGTACCGCGGCCGCA	285
región variable de cadena pesada	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDRGSYGYYYGMDVWGQGTMTVSS	246
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCTT TAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCAC ATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGACAGAGGCA GCTATGGTTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCGAGT	286
cadena ligera (kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS TRWTFGQGTKVEIKRTAAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	325

cadena pesada	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDRGSYGYYYGMDVWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	326
---------------	--	-----

TABLA 17
Clon del anticuerpo B12

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	RASQSISSYLN	79
CDR-L2	AASSLQS	80
CDR-L3	QQSYSTLRT	81
CDR-H1	GYVMH	82
CDR-H2	WINPNSGGTNYAQKFQG	83
CDR-H3	AGASIVGATALDY	84
región variable de cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS TLRTFGQGTKVEIKRTAA	247
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAG CAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAA CAGAGTTACAGTACCCTCCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGG TGGAGATCAAACGTACCGCGGCCGCA	287
región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRAGASIVGATALDYWGQGTLVTVSS	248
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTC ACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAG GGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACA AACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGA CGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAT	288

	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACGAGAGCCGGTGCTTCT ATAGTGGGAGCTACCGCGCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCGAGT	
cadena ligera (kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS TLRTFGQGTKVEIKRTAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKAD YEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	327
cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPNSSGGTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRAGASIVGATALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	328

TABLA 18
Clon del anticuerpo E4

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	TRSSGSIASNYVQ	85
CDR-L2	EDNQRPS	86
CDR-L3	QSYDTGNRNYV	87
CDR-H1	SYTIS	88
CDR-H2	RIIPILGIANYAQKFQG	89
CDR-H3	GPSLNYAGYFDN	90
región variable de cadena ligera	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSP TTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQ SYDTGNRNYVFGTGTQLTVLGQPAAA	249
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGG AAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATT GCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTT CCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATAACCAAAGACCCTCTGGG GTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTC TGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCT GACTACTACTGTCAGTCTTATGATACCGGCAATCGGAATTATGTC TTCGGAAGTGGGACCCAGCTCACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGG CCGCA	289

región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYTISWVRQAPGQG LEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTRDMSTDTAYMELSSLTYDD TAVYFCVRGPSLNYAGYFDNWGQGTLVTVSS	250
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTT CAGCAGCTATACTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAG GGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAA ACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGA CATGTCCACAGACACAGCCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGACAT ATGATGACACGGCCGTATATTTTTGTGTGAGAGGCCCTAGTCTTA ATTATGCCGGCTATTTTGACAACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTC ACCGTCTCGAGT	290
cadena ligera (lambda)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSP TTVIYEDNQRPSPGVDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQ SYDTGNRNYVFGTGTQLTVLGQPAAAPSVTLFPPSSEEIQANKATL VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	329
cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYTISWVRQAPGQG LEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTRDMSTDTAYMELSSLTYDD TAVYFCVRGPSLNYAGYFDNWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHENHYTQKSLSLSLGK	330

TABLA 19
Clon del anticuerpo E12

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QGDSLRSYYAS	91
CDR-L2	GKEKRPS	92
CDR-L3	NSRGSTTDYMV	93
CDR-H1	SYAMH	94
CDR-H2	VISYDGSNKYYADSVKG	95
CDR-H3	ERGSMDV	96
región variable de	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKSGQAPVLV IYGKEKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGARAEDADYYCNSRGS	251

cadena ligera	TTDYMVFGGGTQLTVLGQPAAA	
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCT ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGTCAGGACAGGCCCTGTGTA CTTGTCATCTATGGTAAAGAAAAGCGCCCCTCAGGGATCCCAGA CCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCA TCACTGGGGCTCGGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAC TCCCGGGGCAGCACTACTGACTATATGGTGTTCGGCGGGGGGA CCCAGCTCACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCGCA	291
región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKG LEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARERGSMDVWGQGTLVTVSS	252
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC AGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGG GGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGCAATAAAT ACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC TGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAACGGGGAAAGT GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA GT	292
cadena ligera (lambda)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKSGQAPVLV IYGKEKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGARAEDADYYCNSRGS TTDYMVFGGGTQLTVLGQPAAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	331
cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKG LEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARERGSMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGK	332

TABLA 20
Clon del anticuerpo D1

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
--	--	--------------

CDR-L1	KASQDIDDDMN	97
CDR-L2	EASTLVP	98
CDR-L3	LQHDKFPYT	99
CDR-H1	SYGIS	100
CDR-H2	WINPNSGGTNYAQKFQG	101
CDR-H3	RGVDEGDY	102
región variable de cadena ligera	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQKPGEAAIS IIQEASTLVPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFCLQHDKF PYTFGQGTKLEIKRTAAA	253
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTCATGTCAGCGACTCC AGGAGACAAAGTCAACATCTCCTGCAAAGCCAGCCAAGACATTG ATGATGATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGAGAAGCTGCT ATTTCCATTATTCAAGAAGCTAGTACTCTCGTTCCTGGAATCCCA CCTCGATTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCAC AATTAATAACATAGAATCTGAGGATGCTGCATATTACTTCTGTCT ACAACATGATAAGTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGC TGGAGATCAAACGTACCGCGGCCGCA	293
región variable de cadena pesada	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCASRGVDEGDYWGQGTMTVSS	254
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTT ACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAG GGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCAC AACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGG GACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGA GATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCGGGGGGT TGATGAGGGGGACTACTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTC TCGAGT	294
cadena ligera (kappa)	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQKPGEAAIS IIQEASTLVPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFCLQHDKF PYTFGQGTKLEIKRTAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADY EKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	333
cadena pesada	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYGISWVRQAPGQGL EWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCASRGVDEGDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS	334

	LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	
--	--	--

TABLA 21
Clon del anticuerpo E6

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	TGSSGNIASNYVQ	103
CDR-L2	RDDQRPS	104
CDR-L3	QSYDSSSWV	105
CDR-H1	TYDIT	106
CDR-H2	WMNPNSGNSRSAQKFQG	107
CDR-H3	GDYSGVVLATALDY	108
región variable de cadena ligera	NFMLTQPHSVSESPGKTVTLSTGSSGNIASNYVQWYQHRPGSAP TTVIYRDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLRPEDEADYYC QSYDSSSWVFGGGTKLTVLGQPAAA	255
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCTGGAGTCTCCGGG GAAGACGGTTACCCTCTCCTGCACCGGCAGCAGCGGCAACATT GCCAGTAACTATGTGCAGTGGTACCAGCACCGCCCGGGCAGTG CCCCACCACTGTGATCTACCGGGATGACCAAAGACCCTCTGG AGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCATCGACAGTTCATCCAACT CTGCCTCCCTCACGATCTCTGGACTGAGGCCTGAGGACGAGGC TGACTATTACTGTCAGTCTTATGATAGCAGCTCTTGGGTGTTCTG GCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCG CA	295
región variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTYDITWVRQAPGQGL EWMGWMNPNSGNSRSAQKFQGRVSMSTSDSSISTAYMELSSLRSE DTAVYYCATGDYSGVVLATALDYWGQGTLVTVSS	256
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAGAAGCCTG GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTC ACCACTTATGATATCACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAG GCCTTGAGTGGATGGGATGGATGAACCCGAACAGTGGTAACTC ACGCTCTGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAGCATGACCAGT GACTCCTCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAGGAGACTA CTCGGGTGTGGTACTAACTGCAACAGCACTTGACTACTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	296
cadena ligera (lambda)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTLSTGSSGNIASNYVQWYQHRPGSAP TTVIYRDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLRPEDEADYYC QSYDSSSWVFGGGTKLTVLGQPAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLS	335

	LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTYYDITWVRQAPGQGL EWMGWMNPNSGNSRSAQKFQGRVSM TSDSSISTAYMELSSLRSE DTAVYYCATGDYSGVVL TATALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	336

TABLA 22
Clon del anticuerpo E9

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	SGSSSNIGNNYVY	109
CDR-L2	RNNQRPS	110
CDR-L3	AAWDDSLSGWV	111
CDR-H1	SYGMH	112
CDR-H2	NIKQDGSEKYYVDSVKG	113
CDR-H3	EDRIAAAGMRELDY	114
región variable de cadena ligera	QSELTQLPSASETPGQRTISCSGSSSNIGNNYVYWYQQLPGTAPK LLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAW DDSLSGWVFGGGTKLTVLGQAAA	257
gen que codifica para la región variable de cadena ligera	CAGTCTGAGCTGACTCAGCTACCCCTCAGCGTCTGAGACCCCCG GGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATC GGAAATAATTATGTATACTGGTACCAGCAACTCCCCGGAACGGCC CCCAAACCTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTC CCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCT GGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACT GTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTGTTCGGCGG AGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCGCGGCCGCA	297
región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAREDRIAAAGMRELDYWGQGLTVTVSS	258
gen que codifica para la región variable de cadena	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTC AGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAA ATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA	298

pesada	CAACGCCAAGAACACGCTGTATCTCCAAATGAACAGCCTGAGAG CTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACCGTATA GCAGCAGCTGGGATGCGGGAGTTGGACTACTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	
cadena ligera (lambda)	QSELTQLPSASETPGQRTVISCSSSSNIGNNYVYQQLPGTAPK LLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAW DDSLSGWVFGGGTKLTVLGQPAAPSVTLPSPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	337
cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAREDRIAAAGMRELDYWGGQTLTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK	338

TABLA 23
Clon del anticuerpo A11

	Secuencia de aminoácidos (N→C) / Secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	RSSQSLLHSNGYNYLD	115
CDR-L2	LGSNRAS	116
CDR-L3	MQGTHWPPYT	117
CDR-H1	SYAMT	118
CDR-H2	GISSDGTTTYADSVRG	119
CDR-H3	DQLLGWDALNV	120
región variable de cadena ligera	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSP QLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGT HWPPYTFGQGTKVEIKRTAAA	259
gen que codifica para la región variable de cadena	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGG AGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCAT AGTAATGGATACAACATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCA GTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAACCGGGCCTCCGGG GTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACT GAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC ATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGTACACCTTTGGCCAGGGGACCA	299

ligera	AGGTGGAGATCAAACGTACCGCGGCCGCA	
región variable de cadena pesada	EVQLLESGGGLQPGGFLRLSCAASGFSFTSYAMTWVRQAPGKGLEW VSGISSDGTTTYADSVRGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLRDEDTAVYYC ARDQLLGWDALNVWGQGTMTVSS	260
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGAACAGCCTGGG GGGTTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTTACCAG CTACGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTCTCAGGTATTAGTAGTGATGGGACCACTACAACCTACGCG GACTCCGTGAGGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA ACACGGTGTATCTCCAAATGAACAGTCTGAGAGACGAGGACACGGC TGTGTATTATTGTGCAAGAGATCAATTGTTGGGCTGGGATGCTCTGA ATGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT	300
cadena ligera (kappa)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSP QLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGT HWPPYTFGQGTKVEIKRTAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEK HKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	339
cadena pesada	EVQLLESGGGLQPGGFLRLSCAASGFSFTSYAMTWVRQAPGKGLEW VSGISSDGTTTYADSVRGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLRDEDTAVYYC ARDQLLGWDALNVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVERSKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK	340

Ejemplo 2: Ensayo de las actividades biológicas *in vitro* de los anticuerpos seleccionados

2.1. Ensayo de unión a la superficie de linfocitos citolíticos naturales (células NK)

Para analizar si los 93 anticuerpos seleccionados en el ejemplo 1.4 se unen o no a LILRB1 expresado sobre la superficie de células inmunitarias, se realizó un ensayo de unión a la superficie de linfocitos citolíticos naturales (células NK). Se cultivó una célula NK humana, célula KHYG-1 (JCRB), en medio RPMI 1640 (Gibco) complementado con el 10% (p/v) de SBF (Gibco) y 100 U/ml de interleucina-2 (Novartis). Se añadieron células KHYG-1 a una placa de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en U (BD Falcon) a la cantidad de 5x10⁴ células/pocillo. Se añadió cada uno de los anticuerpos

seleccionados al pocillo hasta la concentración final de 50 µg/ml por pocillo y se incubaron a 4°C durante 1 hora.

Para observar el nivel de unión específica a LILRB1 de los anticuerpos seleccionados, se trató un anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano (Biolegend) de la misma manera. Después de lavar con tampón de FACS, se trataron las células con un anticuerpo anti-Fc humano-biotina (Life Technologies) y se incubaron a 4°C durante 1 hora. Después de lavar con tampón de FACS, se trataron células con estreptavidina PE (BD Pharmigen) y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar con tampón de FACS, se resuspendieron las células y se sometieron a análisis usando un dispositivo iQue screener (Sartorius).

Entre los resultados obtenidos, los resultados para los anticuerpos A10, E3, E4, F12, G1, G9, G11, H2 y H11 se comparan de manera representativa con los del isotipo IgG4 humano (control), que se muestran en la tabla 24. Los diagramas de citometría de flujo para A10, E3 e isotipo IgG4 humano (control) se muestran en las figuras 4a (A10), 4b (E3) y 4c (isotipo IgG4), respectivamente:

TABLA 24

	Intensidad de fluorescencia media	% de población 2
Control de isotipo IgG4 humano	142917,2	2,95
A10	222660,2	28,68
E3	268702,2	40,22
E4	272295,5	43,25
F12	262012,7	38,02
G1	321051,7	56,23
G9	263079,3	41,32
G11	262771,9	40,11
H2	238570,9	29,00
H11	244818,2	32,59

Tal como se muestra en la tabla 24 y las figuras 4a~4c, los anticuerpos sometidos a prueba muestran mayor nivel de unión a células NK humanas (superficie),

en comparación con el del anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano.

2.2. Análisis de inhibición de la unión de LILRB1 a HLA-G mediante los anticuerpos seleccionados

Para analizar si los anticuerpos seleccionados en el ejemplo 1.5 ejercen o no un efecto inhibitor sobre la unión de LILRB1 a su ligando, HLA-G, se analizó el grado de bloqueo mediante los anticuerpos seleccionados.

Para este fin, se usaron células JEG-3 (n.º de cat. de ATCC HTB-36), que muestran un alto nivel de expresión de HLA-G. Se cultivaron las células JEG-3 en medio MEM (Gibco) complementado con el 10% (v/v) de SBF (Gibco) y el 1% (v/v) de pen.-estrep. (Gibco). Se añadieron las células JEG-3 a una placa de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en U (BD Falcon) a la cantidad de 5×10^4 células/pocillo. Se lavó la placa de pocillos con tampón PBS 1X. Se mezclaron cada uno de los anticuerpos seleccionados en el ejemplo 1.5 (A10, E3, F12, G1, G9, H2 y H11) y LILRB1-Fc (RnD systems) en tampón de FACS (PBS 1X + ASB al 1% + EDTA 1 mM) hasta las concentraciones finales de 10 μ g/ml y 5 μ g/ml, respectivamente. Se trataron las células con 100 μ l de la disolución de mezcla por pocillo y se incubaron en hielo durante 2 horas. Se trataron de la misma manera un anticuerpo anti-LILRB1 (clon HP-F1, Abcam) como control positivo y un anticuerpo IgG4 anti-lisozima (clon D1.3) como control negativo. Después de lavar con tampón de FACS dos veces, se trataron las células con anticuerpo PE-anti-hulG-Fc (Biolegend, 10 μ g/ml) y se incubaron en hielo durante una hora. Después de lavar con tampón de FACS dos veces, se resuspendieron las células en 100 μ l del mismo tampón y se sometieron a análisis usando un dispositivo iQue screener (Sartorius).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5. Tal como se muestra en la figura 5, todos los anticuerpos sometidos a prueba A10, E3, F12, G1, G9, H2 y H11 inhiben de manera eficaz la unión de LILRB1-Fc a la línea celular que sobreexpresa HLA-G.

2.3. Ensayo de lisis de células cancerosas por células NK

Para analizar si los anticuerpos seleccionados aumentan o no el grado de la lisis de células cancerosas por células NK, se analizó la tasa de muerte celular de células HEK293 que sobreexpresan HLA-G por células NK KHYG-1. Se añadieron células KHYG-1 (JCRB) a una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (BD Falcon) a la cantidad de 2×10^4 células/pocillo (4×10^4 células/ml, volumen total de 50 μ l). Se trataron las

células con cada anticuerpo (tabla 25) hasta la concentración final de 20 µg/ml por pocillo, y se dejaron a 37°C durante una hora.

Como control negativo, se trató de la misma manera un anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano (Biolegend).

Se tiñeron las células HEK293 que sobreexpresan HLA-G (que se prepararon mediante la transducción de células HEK293 (Colección Americana de Cultivos Tipo) con lentivirus construido para expresar HLA-G) con reactivo IncuCyte CytoLight Rapid Red (Sartorius) según el protocolo del fabricante. Después de una hora, se añadieron las células HEK293 que sobreexpresan HLA-G a la placa a la cantidad de 1x10⁴ células/pocillo (2x10⁴ células/ml, volumen total de 50 µl). Se colocó la placa en un dispositivo IncuCyte S3 (Sartorius) equipado en una incubadora en las condiciones de 37°C y el 5% de CO₂, y se tomaron imágenes de la misma durante 72 horas. Se midió la confluencia de área roja que indica la densidad de células HEK293 que sobreexpresan HLA-G vivas, y se calculó la viabilidad celular. Las viabilidades celulares obtenidas se muestran en la tabla 25 (en la que las viabilidades celulares se muestran como un valor relativo con respecto al del anticuerpo de control (viabilidad celular del pocillo tratado con isotipo IgG4 = 1)):

Viabilidad celular relativa (isotipo IgG4 = 1) =
$$\frac{\text{Valor de confluencia de área roja normalizada del anticuerpo}}{\text{Valor de confluencia de área roja normalizada del isotipo IgG4}}$$

TABLA 25

Anticuerpo	Viabilidad celular relativa (isotipo IgG4 = 1)
Control de isotipo IgG4 humano	1,00
A10	0,70
B9	0,81
D3	0,83
E1	0,82
E3	0,64
F12	0,81
G1	0,64
G6	0,78
G9	0,77
G11	0,82
H2	0,78
H11	0,60

Tal como se muestra en la tabla 25, todos los anticuerpos sometidos a prueba incluyendo A10, B9, D3, E1, E3, F12, G1, G6, G9, G11, H2 y H11 aumentan la muerte celular de las células HEK293 que sobreexpresan HLA-G por KHYG-1, en comparación con la del anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano.

Ejemplo 3: Ensayo de las actividades biológicas *in vivo* de los anticuerpos seleccionados

Entre los anticuerpos seleccionados en el ejemplo 1.5, se sometieron a prueba dos anticuerpos (E3 y B3) para determinar sus eficacias anticancerígenas *in vivo*. Para este fin, se analizó si la administración de los dos anticuerpos reduce o no el tamaño tumoral donde el tumor se generó injertando células de carcinoma colorrectal humano (células de carcinoma colorrectal, línea celular HCT116 Red-Fluc de Bioware Brite (PerkinElmer)) y macrófagos derivados de THP-1 a los ratones. Como control negativo, se trataron ratones con xenoinjerto de cáncer de colon humano preparados tal como anteriormente con un anticuerpo de control de isotipo IgG1 humano (BioXcell, n.º de cat. BP0297). A continuación, en el presente documento, se describen los procedimientos en detalle:

Preparación de macrófagos derivados de THP-1

Se prepararon los macrófagos derivados de THP-1 usados anteriormente diferenciando células THP-1 (ATCC) con forbol-12-miristato-13-acetato 150 nM (PMA, Sigma), 20 ng/ml de interferón gamma (Peprotech) y 10 pg/ml de lipopolisacárido (LPS, Sigma).

Medición de la eficacia anticancerígena en un modelo de ratón

Se les inyectó por vía subcutánea a ratones CIEA NOG [ratón inmunodeficiente NOG] hembra de 5 semanas (Instituto Central para Animales de Experimentación, Japón) una mezcla de 3×10^6 células de carcinoma colorrectal HCT116 Red-Fluc, 3×10^6 células de macrófagos derivados de THP-1 y cada uno de los dos anticuerpos de prueba (anticuerpo E3 o B3; 20 µg por ratón). A partir del 4º día después del injerto del tumor, se administró el anticuerpo al modelo de ratón a la dosificación de 5 mg/kg mediante inyección intraperitoneal dos veces a la semana. Luego, se midió el tamaño (mm³) del tumor injertado y se muestra en la figura 6. Tal como se muestra en la figura 6, todos los anticuerpos sometidos a prueba, particularmente el anticuerpo E3, presentan un efecto estadísticamente significativo de inhibición del crecimiento tumoral en modelos de ratón injertados con células de cáncer de colon HCT116 y macrófagos

derivados de THP-1.

Ejemplo 4: Preparación del anticuerpo anti-LILRB1 (E3.1)

Se amplificó mediante PCR la secuencia de ácido nucleico que codifica para la
cadena pesada de longitud completa (SEQ ID NO: 302) del anticuerpo E3, que se
confirmó que tenía un efecto particularmente significativo en el ejemplo 3. Se amplificó
mediante PCR la secuencia de ácido nucleico que codifica para la región desde Ser1
hasta Leu110 de la región variable de cadena ligera (VL) (SEQ ID NO: 221) del
anticuerpo E3 y se ligó a una secuencia de ácido nucleico que codifica para la región
constante lambda (lambda CL.1, SEQ ID NO: 344) para amplificar la secuencia de ácido
nucleico que codifica para la cadena ligera lambda mediante PCR. Se insertaron las
secuencias amplificadas en un vector de expresión (pTRIOZ-hlgG4, InvivoGen;
alternativamente, puede usarse uno cualquiera de los vectores que comprenden un
promotor de CMV o un promotor de fusión de beta-actina de CMV/CHO (KR10-
1038126B1) y los genes que codifican para la región constante de cadena pesada y la
región constante de cadena ligera lambda de IgG4 humana), en los que el vector de
expresión se diseñó para codificar un anticuerpo IgG4 humano. Se confirmó la
secuencia de ADN del vector de expresión mediante secuenciación.

Se preparó un anticuerpo (E3.1) usando el vector de expresión construido en
referencia al ejemplo 1.4, y se analizó la secuencia del anticuerpo en referencia al
ejemplo 1.6 y se resume en la tabla 26:

TABLA 26

Clon del anticuerpo E3.1

	secuencia de aminoácidos (N→C) / secuencia de ácido nucleico (5'→3')	SEQ ID NO
CDR-L1	QGDSLRFYAS	1
CDR-L2	GKNNRPS	2
CDR-L3	NSRDSSGSHLTGV	3
CDR-H1	SYAMS	4
CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG	5
CDR-H3	DTYYYGSGRSNAFDI	6
región variable de cadena ligera	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRFYASWYQQKSGQAPV LVMYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNS RDSSGSHLTGVFGGGTKVTVL	345
gen que codifica para	TCCTATGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGG GACAGACAGTCAGGATCACATGCCAGGGAGACAGCCTCAGAA	346

la región variable de cadena ligera	ACTTTTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAAGTCAGGACAGGCCCC AGTTCTTGTCATGTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCC CAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTT GACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTAC TGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAGCCATTTGACGGGCGTAT TCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTA	
región variable de cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMISLRA EDTAVYYCARDTYYYGSGRSNAFDIWGQGTLVTVSS	222
gen que codifica para la región variable de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCT GGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA AGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAG CACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTACCATCTCC AGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGATTAGCCT GAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATACG TATTACTATGGTTCGGGGAGAAAGTAATGCTTTTGATATATGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	262
cadena ligera (lambda)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD SLRNFYASWYQQKSGQAPV LVMYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNS RDSSGSHLTGVFGGGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAA SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	347
cadena pesada	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMISLRA EDTAVYYCARDTYYYGSGRSNAFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRV ESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	302

Ejemplo 5: Generación de líneas celulares que sobreexpresan LILR humano

Se amplificaron mediante PCR las secuencias de ácido nucleico que codifican para las proteínas de longitud completa de la familia de LILR humano (tabla 27), y se insertó cada una de las secuencias amplificadas en un vector de expresión (pTRIOZ-hlgG4, InvivoGen; alternatively, puede usarse uno cualquiera de los vectores que

comprenden un promotor de CMV o un promotor de fusión de beta-actina de CMV/CHO (KR10-1038126B1) y los genes que codifican para la región constante de cadena pesada y la región constante de cadena ligera lambda de IgG4 humana). Se confirmó la secuencia de ADN del vector de expresión mediante secuenciación. Se transfectó el vector construido en células CHO para generar 11 líneas celulares estables que sobreexpresan, cada una, proteína LILR en su superficie.

TABLA 27

Proteína	n.º de acceso de Genbank	secuencia de aminoácidos (N→C)	SEQ ID NO	Anticuerpo
LILRB1	AAH15731	MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKP TLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQ EYRLYREKKTAPWITRIPQELVKKGQFPI PSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSESSD PLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGN VTLQCDSQVAFDGFILCKEGEDEHPQCL NSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWW YRCYAYDSNSPYEWSLPSDLLELLVLGV SKKPSLSVQPGPIVAPEETLTLCGSDA GYNRFVLYKDGERDFLQLAGAPQAGL SQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLS SEWSAPSDPLDILIAGQFYDRVSLSVQP GPTVASGENVTLLCQSQGWMQTFLTK EGAADDPWRLRSTYQSQKYQAEFPMG PV TSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLTHPS DPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGP EDQPLTPTGSDPQSG LGRHLGVVIGILVA VILLLLLLLLLFLILRHRRQGKHWTSTQR KADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPA ADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRS PHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPP SPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAA SEAPQDV TYAQLHSLTLRRKATEPPPSQ EGPSPAVPSIYATLAIH	348	anticuerpo humano contra LILRB1 (ab185796, Abcam)
LILRB2	AAH36827	MTPIVTVLICLGLSLGPRTHVQTGTIPKP TLWAEPDSVITQGSPVTLSCQGSLEAQE YRLYREKKSASWITRIRPELVKNGQFHIP SITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPL VLVMTGAYPKPTLSAQSPVVTSGGRVT	349	Anticuerpo humano contra LILRB2/CD85d/ LT4 (MAB2078, R&D Systems)

		LQCESQVAFGGFILCKEGEDEHPQCLN SQPHARGSSRAIFSVGPVSPNRRWSHR CYGYDLNSPYVWSSPSDLLELLVPGVS KKPSLSVQPGPVVAPGESLTLQCVSDV GYDRFVLYKEGERDLRQLPGRQPQAGL SQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAYNLS SEWSAPSDPLDILITGQIHGTPFISVQPG PTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKAG AADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPVTS AHAGTYRCYGSLSNDPYLLSHPSEPLEL VVSGPSMGSSPPPTGPISTPAGPEDQPL TPTGSDPQSGLGRLGVVIGILVAVVLLL LLLLLLFLILRHRRQGKHWTSTQRKADF QHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADA QEENLYAAVKDTQPEDGVEMDTRAAAS EAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQE GEPPAEPSIYATLAIH		
LILRB3	XP_006726 377	MTPALTALLCLGLSLGPRTRVQAGPFPK PTLWAEPGSVISWGSPTIWCQGSLEA QEYRLDKEGSPEPLDRNNPLEPKNKAR FSIPSMTEHHAGRYRCHYYSSAGWSEP SDPLELVMTGfYNKPTLSALPSPVVASG GNMTLRCGSQKGYHHFVLMKEGEHQL PRTLDSQQLHSGGFQALFPVGPVNPSH RWRFTCYYYMNTpqVWSHPDPLEIL PSGVSRKPSLLTLQGPVLAPGQSLTLQC GSDVGyDRFVLYKEGERDFLQRPGQQP QAGLSQANFTLGPVSPSHGGQYRCYG AHNLSSEWSAPSDPLNILMAGQIYDTVS LSAQPGPTVASGENVTLLCQSWWQFDT FLLTKEGAHPPLRLRSMYGAHKYQAEF PMSPVTSAHAGTYRCYGSYSSNPHLLS FPSEPLELMVSGHSGGSSLPPTGPPST PGLGRYLEVLIGVSVAfVLLLFLLLFLLLR RQRHSHKHRTSDQRKTDfQRPAGAAETE PKDRGLLRRSSPAADVQEENLYAAVKDT QSEDRVELDSQSPHDEDPQAVTYAPVK HSSPRREMASPPSSLSGEFLDTKDRQV EEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSL TLRRKATEPPPSQEGEPPAEPSIYATLAI H	350	Anticuerpo humano contra LILRB3/CD85a/I LT5 (MAB1806, R&D Systems)
LILRB4	NP_001265 355	MIPTFTALLCLGLSLGPRTHMQAGPLPK PTLWAEPGSVISWGNsvTIWCQGTLEA	351	Anticuerpo humano contra

		REYRLDKEESPAPWDRQNPKEPNKAR FSIPSMTEYAGRYRCYYRSPVGWSQP SDPLELVMTGAYSKPTLSALPSPLVTSG KSVTLLCQSRSPMDTFLLIKERAAHPLLH LRSEHGAQQHQAEFPMSPVTSVHGGT YRCFSSHGFSHYLLSHPSDPLELIVSGS LEGPRPSPTRS SVSTAAGPEDQPLMPTG SVPHSGLRRHWEVLIGVLVVSILLLSLLL FLLLQHWRRQGKHRTLAQRQADFQRPP GAAEPEPKDGGQLQRRSSPAADVQGENF CAAVKNTQPEDGVEMDTRQSPHDEDP QAVTYAKVKHSRPRREMASPPSPLSGE FLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQD VTYARLHSFTLRQKATEPPPSQEGASPA EPSVYATLAIH		LILRB4/CD85k/IL T3 (MAB24251, R&D Systems)
LILRB5	NP_006831	MTLTLSVLICLGLSVGPRTCVQAGTLPK PTLWAEPASVIARGKPVTLWCQGPLETE EYRLDKEGLPWARKRQNPKEPGAKAKF HIPSTVYDSAGRYRCYYETPAGWSEPS DPLELVATGFYAEP TLLALPSPVVASGGN VTLQCDTLDGLLTFVLVEEEQKLPRTLYS QKLPGGPSQALFPVGPVTPSCRWRFRFC YYYYRKNPQVWSNPDLLEILVPGVSRK PSLLIPQGSVVARGGSLTLQCRSDVGYD IFVLYKEGEHDLVQGSQGPQAGLSQA NFTLGPVSRSHGGQYRCYGAHNLSPR WSAPSDPLDILIAGLIPDIPALSVQPGPKV ASGENVTLLCQSWHQIDTFFLTKEGAAH PPLCLKSKYQSYRHQAEFSMSPV TSAQ GGTYRCYSAIRSYPYLLSSPSYPQELVV SGPSGDPSLSPTGSTPTGPEQDQPLTP TGLDPQSGLGRHLGVVTGVSVAFVLLLF LLLFLLLRHRHQSKHRTSAHFYRPAGAA GPEPKDQGLQKRASPVADIQEEILNAAV KDTQPKDGVEMDARAAAASEAPQDV TYA QLHSLTLRREATEPPPSQEREPPAEP SIY APLAIH	352	Anticuerpo humano contra LILRB5/CD85c/L IR-8 (MAB3065, R&D Systems)
LILRA1	NP_006854	MTPIVTVLICLRLSLGPRTHVQAGTLPKP TLWAEPGSVITQGSPVTLWCQGILETQE YRLYREKKTAPWITRIPQEIVKKGQFPIP SITWEHTGRYRCFYGSHTAGWSEPSDP LELVVTGAYIKPTLSALPSPVVTSGGNVT LHCVSQVAFGSFILCKEGEDEHPQCLNS	353	Anticuerpo humano contra LILRA1/LILRB1 (MAB30851, R&D Systems)

		QPRTHGWSRAIFSVGPVSPSRRWSYR CYAYDSNSPHVWSLPSDLLELLVLGVSK KPSLSVQPGPIVAPGESLTLCQVSDVSY DRFVLYKEGERDFLQLPGPQPQAGLSQ ANFTLGPVSRSYGGQYRCSGAYNLSSE WSAPSDPLDILIAGQFRGRPFISVHPGP TVASGENVTLLCQSWGPFHTFLLTKAGA ADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPVTS HSGTYRCYGSLSNPNYLLSHPSDSLEL MVSGAAETLSPPQNKSDSKAGAANTLS PSQNKTAHPQDYTVENLIRMGIAGLVL VVLGILLFEAQHSQRSL		
LILRA2	AAH17412	MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKP TLWAEPGSVIIQGSPTLRCQGSQAEE YHLYRENKSASWVRRIQEPGKNGQFPIP SITWEHAGRYHCQYYSHNHSSEYSDPL ELVVTGAYSKPTLSALPSPVVTGGNVT LQCVSQVAFDGFILCKEGERDEHPQRLNS HSHARGWSWAIFSVGPVSPSRRWSYR CYAYDSNSPYVWSLPSDLLELLVPGVSK KPSLSVQPGPMVAPGESLTLCQVSDVG YDRFVLYKEGERDFLQRPGWQPQAGLS QANFTLGPVSPSHGGQYRCYSAHNLS EWSAPSDPLDILITGQFYDRPSLSVQPV PTVAPGKNVTLLCQSRGQFHTFLLTKEG AGHPPLHLRSEHQAQQNQAEFRMGPV TSAHVGTYRCYSSLNPNYLLSLPSDPL ELVVSASLGQHPQDYTVENLIRMGVAGL VLVVLGILLFEAQHSQRSLQDAAGR	354	Anticuerpo humano contra LILRA2/CD85h/ LT1 (MAB6364, R&D Systems)
LILRA3	AAH28208	MTSILTVLICLGLSLDPRTHVQAGPLPKP TLWAEPGSVITQGSPTLRCQGSLETQE YHLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPILS ITWEHAGRYCCYGSHTVGLSESSDPLE LVVTGAYSKPTLSALPSPVVTSGGNVTI QCDSQVAFDGFILCKEGERDEHPQCLNS HSHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWSYRC YGYDSRAPYVWSLPSDLLGLLVPGVSK KPSLSVQPGPVVAPGEKLTFCGSDAG YDRFVLYKEWGRDFLQRPGRQPQAGL SQANFTLGPVSRSYGGQYTCSGAYNLS SEWSAPSDPLDILITGQIRARPFLSVRPG PTVASGENVTLLCQSQGMHTFLLTKE GAADSPLRLKSKRQSHKYQAEFPMSPV	355	Anticuerpo humano contra LILRA3/CD85e (PA5-47349, Invitrogen)

		TSAHAGTYRCYGSLSNPYLLTHPSDPL ELVVSGAAETLSPQNKSDSKAGE		
LILRA4	NP_036408	MTLILTSLLFFGLSLGPRTRVQAENLPKPI LWAEPGPVITWHNPVTIWCQGTLEAQG YRLDKEGNSMSRHILKTLESENKVKLSIP SMMWEHAGRYHCYYQSPAGWSEPSD PLELVVTAYSRTLSALPSPVVTSGVNV LRCASRLGLGRFTLIEEGDHRLSWTLNS HQHNHGKFQALFPMGPLTFSNRGTFR YGYENNTPYVWSEPSDPLQLLVSGVSR KPSLLTLQGPVVTGENLTLCQGS IRYTLYKEGADGLPQRPRQPQAGLSQ ANFTLSPVRSYGGQYRCYGAHNVSSE WSAPSDPLDILIAGQISDRPSLSVQPGPT VTSGEKVTLQCQSWDPMFTFLLTKEGAA HPPLRLRSMYGAHKYQAEFPMSPVTS HAGTYRCYGSRSSNPYLLSHPSEPLELV VSGATETLNPAQKKSDSKTAPHLQD YTV ENLIRMGVAGLVLLFLGILLFEA QHSQRS PPRCSQEANSRKDNAPFRV VEPWEQI	356	Anticuerpo contra CD85g (ILT7) (16-5179- 82, Invitrogen)
LILRA5	NP_067073	MAPWSHPSAQLQPVGDAVSPALMVLL CLGLSLGPRTHVQAGNLSKATLWAE PG SVISRGNSVTIRCQGTLEAQEYRL VKEG SPEPWDTQNP LEPKNKARFSIPSMTEH HAGRYRCYYSPAGWSEPSDPLELV VT GFYNKPTLSALPSPVVTSGENV TLQCGR LRFDRFILTEEGDHKLS WTLDSQLTPS GQFQALFPVGPV TPSHRWMLRCYGS R RHILQVWSEPSDLLEIPVSGA ADNLSPS QNKSDSGTASHLQDY AVENLIRMG MAG LILVVLGILIFQDWHSQRSP QAAAGR	357	Anticuerpo humano contra LILRA5/CD85f (MAB6754, R&D Systems)
LILRA6	NP_001347 096	MTPALTALLCLGLSLGPRTRVQAGP FK PTLWAEPGSVISWGSPVTIWC QGSLEA QEYQLDKEGSPEPLDR NNPLEPKNKAR FSIPSMQHHAG RYRCHYYSSAGWSEP SDPLELV MTGFYNKPTLSALPSPVVASG GNMTLRCSQKGYHHFVLMKEGEH QL PRTLDSQQLHSGGFQALFPV GPVTPSH RWRFTCYYYTNTPRV WSHPSDPLEIL PSGVSRKPSLL TLQGPVLAPGQSLTLQC GSDV GYDRFVLYKEGERDFLQRP GQQP QAGLSQANFTLGPVSP SHGGQYRCYG AHNLSSEWSAP SDPLNILMAGQIYDTVS	358	Anticuerpo humano contra LILRA6/CD85b (MAB8656, R&D Systems)

		LSAQPGPTVASGENVTLLCQSRGYFDT FLLTKEGAAHPPLRLRSMYGAHKYQAEF PMSPVTSAHAGTYRCYGSYSSNPHELLS FPSEPLELMVSGHSGGSSLPPTGPPST PASHAKDYTVENLIRMGMAGLVLVFLGIL LFEAQHSQRNPQDAAGR		
--	--	--	--	--

Ejemplo 6: Determinación de CE₅₀ para la unión de los anticuerpos seleccionados a la superficie de células que sobreexpresan LILRB1

Para determinar los valores de CE₅₀ de los anticuerpos preparados en los ejemplos 1 y 4 en cuanto a la unión a líneas celulares que sobreexpresan LILRB1 humano, se realizó un ensayo de unión a la superficie celular. Mediante la representación de los anticuerpos preparados, se midieron los valores de CE₅₀ de los anticuerpos E3.1 y H11. Se añadieron las células CHO preparadas en el ejemplo 5, que sobreexpresan LILRB1 en la superficie, a una placa de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en U (BD Falcon) a la cantidad de 1x10⁵ células/pocillo. Se prepararon diluciones en serie de tres veces de los anticuerpos E3.1 y H11 comenzando a partir de las concentraciones finales de 600 ug/ml y 27 ug/ml, respectivamente. Se trataron las células con cada uno de los anticuerpos diluidos y se incubaron a 4°C durante 60 minutos. Después de lavar con tampón de FACS, se trataron las células con anticuerpo anti-Fc humano-biotina (Invitrogen) y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar con tampón de FACS, se trataron las células con estreptavidina (BD Pharmigen) marcada con PE fluorescente y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar con tampón de FACS, se resuspendieron las células y se sometieron a análisis usando un dispositivo iQue screener (Sartorius). Se calcularon los valores de CE₅₀ usando una fórmula de regresión no lineal del software GraphPad Prism, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 28:

TABLA 28

	E3.1	H11
CE ₅₀ (nM)	7,154	0,376

Ejemplo 7: Evaluación de la reactividad cruzada de los anticuerpos seleccionados con respecto a las líneas celulares que sobreexpresan la familia de LILR humano

Para confirmar si los anticuerpos seleccionados se unen o no a las proteínas de la familia de LILR humano distintas de LILRB1, se realizó un ensayo de unión a la

superficie celular. Se añadieron las células CHO (preparadas en el ejemplo 5) que expresan cada una de las diversas proteínas de la familia de LILR en la superficie a una placa de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en U (BD Falcon) a la cantidad de 1×10^5 células/pocillo. Se trataron las células en cada pocillo con el anticuerpo seleccionado en la concentración final de 20 ug/ml y se incubaron a 4°C durante 60 minutos. Después de lavar con tampón de FACS, se trataron las células con anticuerpo anti-Fc humano-biotina (Invitrogen) y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar con tampón de FACS, se trataron las células con estreptavidina (BD Pharmigen) marcada con PE o FITC fluorescente y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar con tampón de FACS, se resuspendieron las células y se sometieron a análisis usando un dispositivo iQue screener (Sartorius). Se usaron las células tratadas con cada anticuerpo específico de proteína LILR (tabla 27) como control positivo, y se usaron las células tratadas con anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano (Biolegend) como control negativo.

Los resultados obtenidos para el anticuerpo E3.1 se muestran en las figuras 7a a 7d (E3.1: rojo; anticuerpo específico de LILR: azul; control de isotipo (hlgG4): gris), y los resultados obtenidos para el anticuerpo H11 se muestran en las figuras 8a a 8d (H11: rojo; anticuerpo específico de LILR: azul; control de isotipo (hlgG4): gris). Tal como se muestran en las figuras 7a a 7d y las figuras 8a a 8d, los anticuerpos E3.1 y H11 no se unen en absoluto o apenas se unen a los LILR distintos de LILRB1. Estos resultados indican que los anticuerpos proporcionados por los ejemplos tienen capacidades de unión específicamente a LILRB1.

Ejemplo 8: Medición de la liberación de granzima B y perforina mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos (ELISPOT)

Para confirmar si los anticuerpos E3.1 y H11 aumentan el nivel de citotoxicidad de las células NK, se realizó un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos (ELISPOT). Se determinó el nivel de citotoxicidad mediante la liberación de gránulos citotóxicos, granzima B y perforina, en células NK.

Se cultivaron conjuntamente 5×10^3 células de líneas celulares KHYG-1 que expresan LILRB1 (JCRB) y 5×10^3 células de células K562 que sobreexpresan HLA-G (que se prepararon mediante transducción de células K562 (Colección Americana de Cultivos Tipo) con lentivirus contruidos para expresar HLA-G) en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en U. Se añadió a la misma cada anticuerpo (anticuerpo

E3.1, H11 o de control de isotipo IgG4 humano) con una concentración final de 50 ug/ml por cada pocillo y se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos. Se transfirieron las células cultivadas conjuntamente en placas de 96 pocillos (Immunospot, Cat. HGZBPFN-2M) (membrana de PVDF) para ELISPOT, que se recubrieron con anticuerpo anti-perforina y anticuerpo anti-granzima B, respectivamente, y se incubaron además a 37°C durante 8 horas. Se lavaron las membranas de PVDF con una disolución de lavado (Tween 20 al 0,05% en PBS), luego se trataron con anticuerpos anti-granzima B-HRP y anti-perforina-biotina. Luego, se realizaron procedimientos de detección según el protocolo del fabricante. Se secaron las membranas de PVDF a temperatura ambiente durante 24 horas, y se contó el número de puntos para granzima B y perforina mediante un analizador de ELISPOT (Immunospot).

Los resultados se muestran en la figura 9 (granzima B; Gzmb) y la figura 10 (perforina; Prf), respectivamente (el eje Y indica el número total de puntos). Tal como se muestra en la figura 9 y la figura 10, los niveles de liberación tanto de granzima B como de perforina se aumentan significativamente en el grupo tratado con anticuerpo E3.1 o H11, en comparación con el grupo tratado con anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano. Se realizó la prueba de la t para datos independientes, y se realizaron todos los experimentos tres veces en las mismas condiciones para asegurar la fiabilidad del experimento, y los resultados se muestran como valores promedio.

Ejemplo 9: preparación del anticuerpo quimérico GHI/75

Para observar si los anticuerpos proporcionados por los ejemplos muestran mayor eficacia en comparación con los anticuerpos preexistentes, se preparó un anticuerpo quimérico GHI/75 que comprende una región variable de anticuerpo contra GHI/75 (Biolegend, n.º de cat. 333721), que es un anticuerpo anti-LILRB1 humano derivado de ratón y una región constante de anticuerpo humano.

Más específicamente, se analizó la secuencia de aminoácidos del anticuerpo GHI/75 a través de mapeo de péptidos, y se preparó un vector, en el que la secuencia de ácido nucleico correspondiente a la región variable (dominio VH y VL) de un anticuerpo IgG4 humano se reemplazó por la secuencia de ácido nucleico correspondiente a la región variable (dominio VH y VL) de anticuerpo GHI/75 de ratón. En el vector, se sustituyó la región correspondiente a la bisagra superior de IgG4 humana con la secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia de aminoácidos (EPKSCDKTHT; SEQ ID NO: 359) de la bisagra superior de IgG1 humana.

Se expresó el vector tal como se describe en el ejemplo 1.4, y se purificó el anticuerpo obtenido y se usó como anticuerpo comparativo en los ejemplos a continuación.

Ejemplo 10: Medición del efecto inhibidor de los anticuerpos seleccionados en la señalización de LILRB1 usando el ensayo de luciferasa promotora de IL-2

Para confirmar si los anticuerpos preparados en los ejemplos 1 y 4 inhiben la señalización por LILRB1, se realizó un ensayo de indicador de luciferasa. Entre los anticuerpos preparados en los ejemplos 1 y 4, se realizó el ensayo de manera representativa para los anticuerpos E3.1 y H11, y se usó el anticuerpo quimérico GHI/75 preparado en el ejemplo 9 para la comparación. Se usaron células Jurkat que expresan LILRB1 y luciferasa promotora de interleucina 2 (IL-2) (que se prepararon insertando un vector de luciferasa promotora de IL-2 (Promega) en la línea celular Jurkat (Colección Americana de Cultivos Tipo) seguido por transducción con lentivirus construidos para expresar LILRB1) y células K562 que sobreexpresan HLA-G. Se recubrieron placas de noventa y seis pocillos con anticuerpo anti-CD3 (Biolegend) incubando con el anticuerpo durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se añadieron células Jurkat que expresan LILRB1 y luciferasa promotora de IL-2 a placas de 96 pocillos con fondo en U a la cantidad de 1×10^5 células/pocillo, y se trataron las placas con cada anticuerpo (anticuerpo E3.1, anticuerpo H11, anticuerpo quimérico GHI/75 o anticuerpo de isotipo IgG4 humano (control)) hasta la concentración final de 20 ug/ml y se incubaron a 37°C durante una hora. Se añadieron células K562 que sobreexpresan HLA-G (1×10^5 células/pocillo) a las placas y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Se transfirió la suspensión obtenida a la placa recubierta con anticuerpo anti-CD3, y se añadió a la misma anticuerpo anti-CD28 (Biolegend) hasta la concentración final de 10 ug/ml. Se incubó la placa a 37°C durante 6 horas. Se añadió disolución Steady-Glo® (Promega) a cada pocillo, y se registró la intensidad de luminiscencia usando un luminómetro (Envision, PerkinElmer).

Los resultados se muestran en la figura 11. Tal como se muestra en la figura 11, los anticuerpos E3.1 y H11 proporcionados en los ejemplos presentan una actividad inhibidora de la señalización de LILRB1 considerablemente aumentada en comparación con el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano y el anticuerpo quimérico GHI/75 de control.

Ejemplo 11: Análisis del efecto anticancerígeno de los anticuerpos

seleccionados en un modelo de ratón

Para el análisis de los efectos anticancerígenos de los anticuerpos seleccionados, en referencia al ejemplo 3, se le inyectó por vía subcutánea una mezcla de 3×10^6 células de células de carcinoma colorrectal HCT116 Red-Fluc, 3×10^6 células de macrófagos derivados de THP-1 y un anticuerpo ($20 \mu\text{g/ratón}$) a ratones CIEA NOG (ratón inmunodeficiente NOG; Instituto Central para Animales de Experimentación, Japón) hembra de 5 semanas. El anticuerpo usado era un anticuerpo E3.1 o H11, y se usó el isotipo IgG4 humano como anticuerpo de control para la comparación. A partir del 4º día después del injerto de células tumorales, se administró el anticuerpo al modelo de ratón a la dosificación de 5 mg/kg mediante inyección intraperitoneal dos veces a la semana, y se midió el volumen tumoral y se muestra en la figura 12. Tal como se muestra en la figura 12, los anticuerpos E3.1 y H11 presentan un efecto significativo de inhibición del crecimiento tumoral en modelos de ratón injertados con células de cáncer de colon HCT116 y macrófagos derivados de THP-1 en comparación con el anticuerpo de control.