

ANTICUERPOS ANTI-CD19 HUMANO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a anticuerpos que se unen a CD19 humano ("anticuerpos anti-CD19 humano" o "anticuerpos anti-CD19"), composiciones que comprenden dichos anticuerpos anti-CD19 humano y métodos para usar dichos anticuerpos anti-CD19 humano.

ANTECEDENTES

Las células B pueden producir anticuerpos contra varios antígenos y, por tanto, desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria humoral. Además, las células B también funcionan como células presentadoras de antígeno (APC) y secretan citocinas. Las células B expresan el receptor de células B (BCR) en sus membranas celulares; y BCR permite que la célula B se una a un antígeno específico, contra el cual iniciará una respuesta de anticuerpos. La desregulación de las células B se asocia con una variedad de trastornos.

El antígeno de linfocito B humano CD19 (también conocido como clúster de diferenciación 19, antígeno de superficie de linfocitos B B4, antígeno de superficie de linfocitos T Leu-12 o CVID3) es una proteína transmembrana que se expresa ampliamente durante todas las fases del desarrollo de las células B hasta su diferenciación terminal en células plasmáticas. Por tanto, el CD19 humano es un marcador de células pan-B. El CD19 se encuentra asociado con CD21, un receptor del complemento, y con CD81, un miembro de la familia tetraspan (Carter, y otros, Immunol. Res. 26: 45-54, 2002). CD19 es un correceptor de BCR y actúa como una proteína adaptadora para reclutar proteínas de señalización citoplasmáticas al complejo BCR. CD19 es necesario para la función normal de las células B y está involucrado en diversas respuestas de las células B, que incluyen la supervivencia, proliferación, activación y diferenciación de las células B.

Los anticuerpos anti-CD19 humano se han descrito anteriormente y se evalúan en ensayos clínicos. Muchos anticuerpos anti-CD19 humano conocidos son anticuerpos depletantes de las células B; por ejemplo, inebilizumab (también conocido como MEDI-551) y tafasitamab (también conocido como MOR208 o XmAb5574) en los ensayos clínicos de fase III, loncastuximab en el ensayo clínico de fase II, 4G7SDIE y DI-B4 en el ensayo clínico de fase I, se informaron como anticuerpos depletantes de las células B (Cree, y otros, Lancet. 394(10206):1352-1363, 2019; Kellner y otros,

Leukemia. 27(7):1595–1598, 2013; Kaplan y otros, MAbs. 12(1): 1703531, 2020; Seidel y otros, Mol. Ther. 24(9):1634-43, 2016; WO2007076950).

Obexelimab (también conocido como XmAb5871) es un anticuerpo modificado genéticamente con Fc que se une tanto a CD19 como a FcγRIIb e inhibe la función de las células B tras involucrar la señalización del receptor inhibidor FcγRIIb (Szili, y otros, MAbs. 6(4): 991–999, 2014). Sin embargo, la unión de alta afinidad de obexelimab a FcγRIIb podría conducir a una unión no específica a otros tipos de células. En pacientes humanos, se informó que obexelimab tiene una vida media corta, con $T_{1/2}$ de $3,5 \pm 1,0$ días; y reduce los conteos de células B humanas periféricas, con una reducción media de aproximadamente 30-40 % del nivel inicial (Jaraczewska-Baumann, y otros, European League Against Rheumatism (EULAR) 2015 Annual Meeting Poster: *A Phase 1b/2a Study of the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of XmAb@5871 in Patients with Rheumatoid Arthritis*, 12 de junio de 2015, disponible en <https://investors.xencor.com/static-files/0017dcf1-deb2-46eb-93ff-90ba164ec50c>).

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de anticuerpos anti-CD19 humano alternativos que se unan e inhiban específicamente las células B humanas, sin depletarlas, para tratar los trastornos asociados a las células B.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos que se unen a CD19 humano e inhiben las respuestas de las células B (por ejemplo, proliferación, activación y diferenciación) sin depletar las células B (es decir, "anticuerpos anti-CD19 humano no depletantes"). Dichos anticuerpos anti-CD19 humano no depletantes pueden usarse para tratar trastornos asociados a las células B, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, sin destruir esas importantes células inmunitarias, y así evitar inmunodepresión concurrente problemática, supresión inmunitaria a largo plazo y otras complicaciones resultantes de la depleción de células B. Los anticuerpos anti-CD19 humano proporcionados en la presente descripción tienen una o más de las siguientes propiedades: 1) se unen a CD19 humano (y a veces CD19 de mono cinomolgo) con afinidades de unión y/o tasas de asociación y disociación deseables, 2) se unen específicamente a células B humanas e inhiben la proliferación, activación y/o diferenciación de células B humanas primarias, 3) no depletan las células B humanas, 4) se internalizan en células B humanas, 5) bajo riesgo de inmunogenicidad, 6) baja hidrofobicidad y/o 7) buena estabilidad, solubilidad, viscosidad y características

farmacocinéticas para el desarrollo y uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios. Como se describe a continuación, en una comparación en paralelo, se muestra que uno de dichos anticuerpos anti-CD19 humano CB3f se une a células B humanas con alta especificidad en un análisis de sangre total, mientras que obexelimab muestra unión no específica a neutrófilos humanos además de unión a células B. Dado que los neutrófilos son el tipo de glóbulos blancos más abundante en humanos, la unión inespecífica a los neutrófilos podría explicar la vida media corta de obexelimab observada en pacientes humanos. Además, en un ensayo de apoptosis de células B *in vitro*, se muestra que obexelimab induce apoptosis de las células B humanas primarias de una manera dependiente de la dosis, mientras que el anticuerpo CB3f anti-CD19 humano no induce apoptosis de las células B humanas primarias en el mismo ensayo.

En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan nuevos anticuerpos anti-CD19 humano no reductores. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD19 humano son anticuerpos completamente humanos.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que se unen a CD19 humano, en donde los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VH comprende regiones determinantes de complementariedad de cadenas pesadas (HCDR) HCDR1, HCDR2, y HCDR3, y la VL comprende regiones determinantes de complementariedad de cadenas ligeras (LCDR) LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 29, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 30, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 31, la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 32, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 33, y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 34. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD19 humano comprenden una VH que comprende la SEQ ID NO: 37 y una VL que comprende la SEQ ID NO: 41.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD19 humano tiene un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD19 humano tiene un isotipo IgG4 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD19 humano tiene una región bisagra de IgG4 humana modificada que comprende una mutación S228P (de acuerdo con EU Index Numbering), que reduce el intercambio del brazo Fab de IgG4 *in vivo* (véase Labrijn, y otros, Nat. Biotechnol, 2009, 27(8): 767). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD19 humano tiene un isotipo IgG1 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD19 humano tiene una región Fc de IgG1

humana modificada que tiene reducidas o eliminadas las funciones efectoras de Fc tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Dicho anticuerpo se denomina anticuerpo "nulo efector de IgG1".

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD19 humano tiene un isotipo IgG4 humano. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) que comprende la SEQ ID NO: 35 y una cadena ligera (LC) que comprende la SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un isotipo IgG1 humano. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo comprende una HC que comprende la SEQ ID NO: 50 y una LC que comprende la SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo nulo efector de IgG1. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo comprende una HC que comprende la SEQ ID NO: 52 y una LC que comprende la SEQ ID NO: 39.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab o scFv) que se unen a CD19 humano, en donde los fragmentos de anticuerpos comprenden una VH y una VL, en donde la VH comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y la VL comprende LCDR1, LCDR2, y LCDR3, en donde la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 29, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 30, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 31, la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 32, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 33, y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 34. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo comprenden una VH que comprende la SEQ ID NO: 37 y una VL que comprende la SEQ ID NO: 41.

En la presente descripción se proporcionan además anticuerpos que se unen a CD19 humano, en donde los anticuerpos comprenden una VH y una VL, en donde la VH comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y la VL comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 29, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 30, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 31, la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 43, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 44 y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 45. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD19 humano comprenden una VH que comprende la SEQ ID NO: 37 y una VL que comprende la SEQ ID NO: 48. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un isotipo IgG4 humano. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo comprende una HC que comprende la SEQ ID NO: 35 y una LC que comprende la SEQ ID NO: 46. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un isotipo IgG1 humano. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo comprende una HC que comprende la SEQ ID NO: 50 y

una LC que comprende la SEQ ID NO: 46. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo nulo efector de IgG1. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo comprende una HC que comprende la SEQ ID NO: 52 y una LC que comprende la SEQ ID NO: 46.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab o scFv) que se unen a CD19 humano, en donde los fragmentos de anticuerpos comprenden una VH y una VL, en donde la VH comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y la VL comprende LCDR1, LCDR2, y LCDR3, en donde la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 29, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 30, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 31, la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 43, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 44, y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 45. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo comprenden una VH que comprende la SEQ ID NO: 37 y una VL que comprende la SEQ ID NO: 48.

Además, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que se unen a CD19 humano, en donde los anticuerpos comprenden una VH y una VL, en donde la VH comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y la VL comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 15, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 16, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 17, la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 18, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 19 y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD19 humano comprenden una VH que comprende la SEQ ID NO: 23 y una VL que comprende la SEQ ID NO: 27. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un isotipo IgG4 humano. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo comprende una HC que comprende la SEQ ID NO: 21 y una LC que comprende la SEQ ID NO: 25. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un isotipo IgG1 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo nulo efector de IgG1. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo comprende una HC que comprende la SEQ ID NO: 54 y una LC que comprende la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab o scFv) que se unen a CD19 humano, en donde los fragmentos de anticuerpos comprenden una VH y una VL, en donde la VH comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y la VL comprende LCDR1, LCDR2, y LCDR3, en donde la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 15, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 16, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 17, la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 18, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 19, y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO:

20. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo comprenden una VH que comprende la SEQ ID NO: 23 y una VL que comprende la SEQ ID NO: 27.

Además, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que se unen a CD19 humano, en donde los anticuerpos comprenden una VH y una VL, en donde la VH comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y la VL comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 1, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 2, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 3, la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 4, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 5 y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD19 humano comprenden una VH que comprende la SEQ ID NO: 9 y una VL que comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una HC que comprende la SEQ ID NO: 7 y una LC que comprende la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab o scFv) que se unen a CD19 humano, en donde los fragmentos de anticuerpos comprenden una VH y una VL, en donde la VH comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y la VL comprende LCDR1, LCDR2, y LCDR3, donde la HCDR1 comprende la SEQ ID NO: 1, la HCDR2 comprende la SEQ ID NO: 2, la HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 3, la LCDR1 comprende la SEQ ID NO: 4, la LCDR2 comprende la SEQ ID NO: 5, y la LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo comprenden una VH que comprende la SEQ ID NO: 9 y una VL que comprende la SEQ ID NO: 13.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada o cadena ligera, o una VH o VL, de los anticuerpos anti-CD19 humano novedosos descritos en la presente descripción, y vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada o cadena ligera de los anticuerpos anti-CD19 humano descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica la SEQ ID NO: 35, 52, 50, 39, 46, 21, 54, 25, 7 u 11. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 35, 52, 50, 21, 54 o 7. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 36, 53, 51, 22, 55 u 8. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos

que comprenden una secuencia que codifica una cadena ligera de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 39, 46, 25 u 11. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 40, 47, 26 o 12.

Además, en la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una VH o VL de los anticuerpos anti-CD19 humano descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica las SEQ ID NO: 37, 23, 27, 9, 41, 48, 13. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica una VH de anticuerpo que comprende las SEQ ID NO: 37, 23, 27, 9. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 38, 24, 28, 10. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica una VL de anticuerpo que comprende las SEQ ID NO: 41, 48, 13. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 42, 49, 14.

En la presente descripción se proporcionan además vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo. Por ejemplo, dichos vectores pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 35, 52, 50, 39, 46, 21, 54, 25, 7 u 11. En algunas modalidades, el vector comprende la SEQ ID NO: 36, 53, 51, 40, 47, 22, 55, 26, 8 o 12.

En la presente descripción se proporcionan además vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una VH o VL de anticuerpo. Por ejemplo, dichos vectores pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 37, 23, 27, 9, 41, 48 o 13. En algunas modalidades, el vector comprende la SEQ ID NO: 38, 24, 28, 10, 42, 49 o 14.

En la presente descripción se proporcionan además vectores que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de anticuerpo y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo. En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 35, 50 o 52, y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 39 o 46. En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 21 o 54, y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 35 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 52 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 50 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 35 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 46. En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 52 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 46. En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 50 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 46. En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 21 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 25. En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 54 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 25. En algunas modalidades, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 7 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 11.

También se proporcionan composiciones que comprenden un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo. En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 35, 52 o 50, y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 39 o 46. En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 21 o 54, y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 35 y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que

comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 52 y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 50 y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 35 y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 46. En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 52 y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 46. En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 50 y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 46. En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 21 y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 25. En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 54 y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 25. En algunas modalidades, la composición comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 7 y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 11.

Los ácidos nucleicos de la presente descripción pueden expresarse en una célula huésped, por ejemplo, después de que los ácidos nucleicos se hayan unido operativamente a una secuencia de control de expresión. Las secuencias de control de expresión capaces de expresar ácidos nucleicos a los que están operativamente enlazadas se conocen bien en la técnica. Un vector de expresión puede incluir una secuencia que codifica uno o más péptidos señal que facilitan la secreción del(los) polipéptido(s) de una célula huésped. Los vectores de expresión que contienen un ácido nucleico de interés (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo) pueden transferirse a una célula huésped mediante métodos bien conocidos, por ejemplo, transfección, transformación, transducción o infección estable o transitoria. Además, los vectores de expresión

pueden contener uno o más marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina y dihidrofolato reductasa, para ayudar en la detección de células huéspedes transformadas con las secuencias de ácido nucleico deseadas.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan células, por ejemplo, células huéspedes, que comprenden los ácidos nucleicos, vectores o composiciones de ácidos nucleicos descritos en la presente descripción. Una célula huésped puede ser una célula transfectada, transformada, transducida o infectada de manera estable o transitoria con uno o más vectores de expresión que expresan todo o una parte de un anticuerpo descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula huésped puede transfectarse, transformarse, transducirse o infectarse de manera estable o transitoria con un vector de expresión que expresa polipéptidos HC y LC de un anticuerpo de la presente descripción. En algunas modalidades, una célula huésped puede transfectarse, transformarse, transducirse o infectarse de manera estable o transitoria con un primer vector que expresa polipéptidos HC y un segundo vector que expresa polipéptidos LC de un anticuerpo descrito en la presente descripción. Dichas células huéspedes, por ejemplo, células huéspedes de mamíferos, pueden expresar los anticuerpos anti-CD19 humano descritos en la presente descripción. Las células huéspedes de mamíferos que se conoce que son capaces de expresar anticuerpos incluyen células CHO, células HEK293, células COS y células NS0.

En algunas modalidades, la célula, por ejemplo, la célula huésped, comprende un vector que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 35, 50 o 52, y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 39 o 46. En algunas modalidades, la célula, por ejemplo, la célula huésped, comprende un vector que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 21 o 54, y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, la célula, por ejemplo, la célula huésped, comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 35, 52 o 50, y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 39 o 46. En algunas modalidades, la célula, por ejemplo, la célula huésped, comprende un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 21 o 54, y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 25.

La presente descripción proporciona además un proceso para producir un

anticuerpo anti-CD19 humano descrito en la presente descripción mediante el cultivo de la célula huésped descrita anteriormente, por ejemplo, una célula huésped de mamífero, en condiciones tales que el anticuerpo se expresa y recupera el anticuerpo expresado del medio de cultivo. El medio de cultivo, en el que se ha secretado un anticuerpo, puede purificarse mediante técnicas convencionales. Pueden emplearse diversos métodos de purificación de proteínas, y dichos métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3ra edición, Springer, NY (1994).

También se proporcionan anticuerpos producidos por cualquiera de los procesos descritos en la presente descripción.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, ácido nucleico o vector descrito en la presente descripción. Dichas composiciones farmacéuticas también pueden comprender uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse a través de métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22ª edición (2012), A. Loyd y otros, Pharmaceutical Press).

Los anticuerpos anti-CD19 humano, los ácidos nucleicos, vectores o composiciones farmacéuticas descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar trastornos asociados a las células B. Debido a su papel fundamental en la regulación del sistema inmunitario, la desregulación de las células B se asocia con una variedad de trastornos. Los trastornos asociados a las células B incluyen enfermedades autoinmunitarias, que son causadas por la activación de células B y células T autorreactivas, y linfomas y leucemias, que son causadas por una proliferación excesiva y/o incontrolada de las células B. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias asociadas a las células B incluyen artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, púrpura trombocitopénica idiopática, diabetes tipo 1, pénfigo vulgar, neuromielitis óptica, vasculitis ANCA (vasculitis asociada a anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos) miastenia gravis.

Dado que los anticuerpos anti-CD19 humano descritos en la presente descripción no depletan las células B, ofrecen ventajas sobre los anticuerpos depletantes de las células B para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y pueden evitar la inmunodepresión concurrente problemática, la inmunosupresión a

largo plazo y otras complicaciones resultantes de la depleción de las células B. Como se muestra a continuación, los anticuerpos anti-CD19 humano descritos en la presente descripción se internalizan en células B humanas primarias. Por tanto, los anticuerpos anti-CD19 humano descritos en la presente descripción también pueden usarse para suministrar otros agentes terapéuticos en células B humanas.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan métodos para tratar un trastorno asociado a las células B, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) que lo necesite, tras administrar al sujeto una cantidad con eficacia terapéutica de un anticuerpo anti-CD19 humano, un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo anti-CD19 humano, un vector que comprende dicho ácido nucleico o una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo anti-CD19 humano, el ácido nucleico o vector, como se describe en la presente descripción. Los anticuerpos, ácidos nucleicos, vectores o composiciones farmacéuticas descritos en la presente descripción pueden administrarse por vías parenterales (por ejemplo, subcutánea e intravenosa). En algunas modalidades, el trastorno asociado a las células B se selecciona de lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, púrpura trombocitopénica idiopática, diabetes tipo 1, pénfigo vulgar, neuromielitis óptica, vasculitis ANCA, miastenia gravis.

Además, se proporcionan anticuerpos anti-CD19 humano, ácidos nucleicos, vectores o composiciones farmacéuticas descritos en la presente descripción para su uso en terapia. Además, la presente descripción proporciona además anticuerpos anti-CD19 humano, ácidos nucleicos, vectores o composiciones farmacéuticas descritos en la presente descripción para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a las células B, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, trombocitopenia púrpura idiopática, diabetes tipo 1, pénfigo vulgar, neuromielitis óptica, vasculitis ANCA, miastenia gravis.

En la presente descripción se proporciona además el uso de anticuerpos anti-CD19 humano, ácidos nucleicos, vectores o composiciones farmacéuticas descritos en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado a las células B, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, púrpura trombocitopénica idiopática o diabetes tipo 1, pénfigo vulgar, neuromielitis óptica, vasculitis ANCA, miastenia gravis.

Como se usa en la presente descripción, los términos "un", "una", "el/la" y términos similares usados en el contexto de la presente descripción (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) debe interpretarse que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente descripción o se contradiga claramente por el contexto.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une a un antígeno. Las modalidades de un anticuerpo incluyen un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico o anticuerpo conjugado. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA) y de cualquier subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

Un anticuerpo ilustrativo es un anticuerpo de tipo inmunoglobulina G (IgG) compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) que se entrecruzan mediante enlaces disulfuro entre cadenas. La porción amino terminal de cada una de las cuatro cadenas polipeptídicas incluye una región variable de aproximadamente 100-125 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento antigénico. La porción carboxilo terminal de cada una de las cuatro cadenas polipeptídicas contiene una región constante principalmente responsable de la función efectora. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (VH) y una región constante de la cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (VL) y una región constante de la cadena ligera. El isotipo IgG puede dividirse adicionalmente en subclases (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4).

Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones marco (FR). Las CDR están expuestas en la superficie de la proteína y son regiones importantes del anticuerpo para la especificidad de unión al antígeno. Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En la presente descripción, las tres CDR de la cadena pesada se denominan "HCDR1, HCDR2 y HCDR3", y las tres CDR de la cadena ligera se denominan "LCDR1, LCDR2 y LCDR3". Las CDR contienen la mayoría de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La asignación de residuos de aminoácidos a las CDR puede realizarse de acuerdo con esquemas bien conocidos, lo

que incluye los descritos en Kabat (Kabat y otros, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), Chothia (Chothia y otros, "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani y otros, "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)), North (North y otros, "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)), o IMGT (la base de datos internacional ImMunoGeneTics disponible en www.imgt.org; véase Lefranc y otros, Nucleic Acids Res. 1999; 27: 209-212). Las definiciones de North CDR se usan para los anticuerpos anti-CD19 humano descritos en la presente descripción.

Las modalidades ilustrativas de anticuerpos de la presente descripción también incluyen fragmentos de anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno, que comprenden al menos una parte de un anticuerpo que retiene la capacidad de interactuar específicamente con un antígeno como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, scFab, Fv unidos por disulfuro (sdFv), un fragmento Fd y anticuerpos lineales.

Los términos "unir" y "une" como se usan en la presente descripción pretenden significar, a menos que se indique lo contrario, la capacidad de una proteína o molécula para formar un enlace químico o interacción atractiva con otra proteína o molécula, lo que da como resultado la proximidad de las dos proteínas o moléculas según se determina por métodos comunes conocidos en la técnica.

El término "CD19" como se usa en la presente descripción, a menos que se indique lo contrario, se refiere al antígeno de linfocito B humano CD19 (también conocido como clúster de diferenciación 19, antígeno de superficie de linfocito B B4, antígeno de superficie de linfocito T Leu-12 o CVID3). La secuencia de aminoácidos del CD19 humano se conoce en la técnica, por ejemplo, la secuencia de referencia NCBI NP_001171569.1 (isoforma 1, SEQ ID NO: 56) o NP_001761.3 (isoforma 2, SEQ ID NO: 57). La isoforma 2 es una variante de empalme de la isoforma 1 y es un aminoácido más corta que la isoforma 1 en el dominio intracelular. El término "CD19" se usa en la presente descripción para referirse colectivamente a todas las isoformas y formas polimórficas de CD19 humano conocidas.

El término "región Fc", como se usa en la presente descripción, se refiere a una región de un anticuerpo, que comprende los dominios CH₂ y CH₃ de la cadena pesada del anticuerpo. Opcionalmente, la región Fc puede incluir una parte de la región bisagra o la región bisagra completa de la cadena pesada del anticuerpo.

El término "anticuerpo no depletante" como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo que no reduce significativamente el número de células B en un sujeto después del tratamiento, en comparación con el número de células B antes del tratamiento. El número de células B puede medirse mediante el uso de ensayos bien conocidos como los descritos en los Ejemplos. Un anticuerpo no depletante típicamente no induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC) o apoptosis de las células B.

Los términos "ácido nucleico" o "polinucleótido", como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a polímeros de nucleótidos, incluidas moléculas monocatenarias y/o bicatenarias que contienen nucleótidos, como moléculas de ADN, ADNc y ARN, que incorporan nucleótidos nativos, modificados y/o análogos. Los polinucleótidos de la presente descripción también pueden incluir sustratos incorporados en ellos, por ejemplo, mediante ADN o ARN polimerasa o una reacción sintética.

El término "sujeto", como se usa en la presente descripción, se refiere a un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un ser humano, chimpancé, simio, mono, res, caballo, oveja, cabra, cerdo, conejo, perro, gato, rata, ratón, curiel y similares. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

El término "cantidad con eficacia terapéutica", como se usa en la presente descripción, se refiere a una cantidad de una proteína o ácido nucleico o vector o composición que provoca la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, la reducción o inhibición de una enzima o actividad de una proteína, o mejora los síntomas, alivia las condiciones, ralentiza o retrasa la progresión de la enfermedad, o evita una enfermedad, etc. En una modalidad no limitante, el término "una cantidad con eficacia terapéutica" se refiere a la cantidad de una proteína o ácido nucleico o vector o composición que, cuando se administra a un sujeto, es eficaz para aliviar, inhibir, evitar y/o mejorar al menos parcialmente una afección, un trastorno o una enfermedad.

Como se usa en la presente descripción, "tratamiento" o "tratar" se refiere a todos los procesos en donde puede haber una ralentización, control, retraso o detención de la progresión de los trastornos o enfermedades descritos en la presente descripción, o mejora del trastorno o los síntomas de la enfermedad, pero no necesariamente indica una eliminación total de todos los síntomas de los trastornos o enfermedades. El tratamiento incluye la administración de una proteína o ácido

nucleico o un vector o composición para el tratamiento de una enfermedad o afección en un paciente, particularmente en un ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las **Figuras 1A-1B** muestran los perfiles de hidrofobicidad de superficie del anticuerpo parental anti-CD19 humano C323 (**Figura 1A**) y el anticuerpo anti-CD19 humano optimizado CB3f (**Figura 1B**).

La **Figura 2** muestra la unión de anticuerpos anti-CD19 humano a CD19 humano en un ensayo ELISA.

La **Figura 3** muestra la inhibición de la proliferación de células B primarias por el mAb anti-CD19 humano CB3f.

La **Figura 4** muestra la inhibición de la activación de células B en sangre total por el mAb anti-CD19 humano CB3f.

La **Figura 5** muestra la inhibición de la diferenciación de células B en plasmablastos por el mAb anti-CD19 humano CB3f.

Las **Figuras 6A-6B** muestran que el mAb anti-CD19 humano CB3f carece de actividades CDC (**Figura 6A**) y ADCC (**Figura 6B**).

La **Figura 7** muestra la especificidad de unión del mAb anti-CD19 humano CB3f y obexelimab a células en sangre total humana.

La **Figura 8** muestra la diferencia en la inducción de la apoptosis de células B por obexelimab y mAb anti-CD19 humano CB3f.

Las **Figuras 9A-9B** muestran la reducción de IgM humana en ratones NSG tratados con mAb anti-CD19 humano CB3f el día 6 (**Figura 9A**) y el día 10 (**Figura 9B**) después del tratamiento.

La **Figura 10** muestra la reducción de la expresión de CD86 en células B humanas en ratones NSG tratados con mAb anti-CD19 humano CB3f.

La **Figura 11** muestra la frecuencia de células B en ratones NSG tratados con mAb anti-CD19 humano CB3f.

La **Figura 12** muestra la internalización de mAb1 anti-CD19 humano (CB3f) y mAb2 anti-CD19 humano (C323.C1) en células B humanas primarias.

Las **Figuras 13A-13B** muestran la comparación de la eficacia de un Ab sustituto de CD19 no depletante y un Ab sustituto de CD20 depletante en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratón. La **Figura 13A** muestra el tratamiento con el Ab sustituto de CD19 no depletante en el modo semiestablecido con una puntuación clínica reducida mayor que el Ab sustituto de CD20 depletante en el modelo de CIA en

ratón. Puntuaciones clínicas de ratones entre el día 21 y el día 42 del estudio (n = 12/grupo excepto n = 5 para el grupo control sin enfermedad tratado con control de isotipo). Los símbolos representan la media del grupo y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los animales se dosificaron a partir del día 19. **La Figura 13B** muestra que el tratamiento con el Ab sustituto de CD19 no depletante redujo el AUC de puntuación clínica (días 24 a 42) más que el Ab sustituto de CD20 depletante en el modelo de CIA en ratón. AUC de la puntuación clínica de los ratones entre el día 24 y el día 42 del estudio (n = 12/grupo excepto n = 5 para el grupo control sin enfermedad tratado con control de isotipo). Las barras representan la media del grupo y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los ratones se dosificaron a partir del día 19. Las barras que no comparten una letra común son significativamente diferentes entre sí ($p < ,05$ análisis de varianza unidireccional (ANOVA) post-hoc de Tukey).

La **Figura 14** muestra que el tratamiento con el Ab sustituto de CD19 no depletante en el modo semiterapéutico retardó y redujo la incidencia de la diabetes más que el Ab sustituto de CD20 depletante en el modelo NOD de diabetes tipo 1. Incidencia de la diabetes (los ratones con niveles de glucosa en sangre superiores a 240 mg/dl se consideraron diabéticos). n = 10/grupo, excepto n = 9 para el grupo no tratado). Los animales se dosificaron a partir de las 12 semanas de edad.

La **Figura 15** muestra que el tratamiento con el Ab sustituto de CD19 no depletante en modo semiterapéutico redujo la puntuación clínica más que el Ab sustituto de CD20 depletante en el modelo de EAE en ratón. Puntuaciones clínicas de ratones entre el día 6 y el día 42 del estudio (n = 12/grupo). Los símbolos representan la media del grupo y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los animales se dosificaron a partir del día 6. * $p < 0,05$ vs control de isotipo del mismo día.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos que se unen a CD19 humano (anticuerpos anti-CD19 humano).

El anticuerpo C323 anti-CD19 humano se descubre a partir de una biblioteca de presentación de fagos mediante el uso de selección basada en células contra

células de riñón embrionario humano (HEK) transfectadas conjuntamente con CD19 humano (SEQ ID NO: 56) y su correceptor CD21. Se usa una selección negativa contra las células HEK-293 parentales para eliminar los aglutinantes celulares no específicos. La unión específica de CD19 se confirma mediante el uso de la proteína de dominio extracelular (ECD) de CD19 mediante ELISA. Después de la conversión al formato de IgG y la purificación, la unión celular se confirma mediante el uso de la línea celular de linfoma de Burkitt humano Daudi y células B humanas primarias aisladas por FACS.

La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) es una técnica para la separación de proteínas comúnmente usada para la caracterización de variantes de anticuerpos; y el tiempo de retención en la columna HIC de una proteína de interés refleja su hidrofobicidad general (J Pharm Biomed Anal. 2016 130: 3-18). Se considera que C323 es hidrófobo debido al tiempo prolongado de retención en la columna de HIC. La hidrofobicidad del anticuerpo puede causar problemas de fabricación, como expresión y agregación de proteínas deficientes. La mutagénesis dirigida y aleatoria se usa para mejorar las propiedades biofísicas del C323 y aumentar su afinidad y potencia. Se crea un modelo de homología de la región variable del mAb parental anti-CD19 humano C323. Un algoritmo de propensión a la agregación espacial se aplica después al modelo para identificar parches hidrófobos expuestos en la superficie. Este proceso identifica ocho residuos hidrófobos expuestos a la superficie dentro de LCDR1, HCDR2 y HCDR3: LCDR1: Y31, Y32; HCDR2: I52, I53 y F54; HCDR3: F97, Y99 e Y100a (numeración Kabat) (**Figura 1A**). Estos residuos se dirigen a mutagénesis. Se crean bibliotecas que incluyen más aminoácidos hidrófilos (polares o cargados) mediante el uso de oligonucleótidos mutagénicos basados en codones VVK y se incorporan mediante el uso de mutagénesis de Kunkel en una plantilla de ADN monocatenario que contiene uracilo que codifica el anticuerpo parental C323 original con las secuencias de CDR seleccionadas delecionadas. Los Fab expresados en fagos se seleccionan mediante el uso del antígeno ECD CD19 humano biotinilado. Las mutaciones de afinidad neutra identificadas de esta manera son clones únicos y secuenciados de ADN expresados como Fab periplásmico en *E. coli* y analizados mediante ELISA de titulación. Este proceso identificó tres sustituciones de aminoácidos de afinidad neutra pero más hidrófilas: LCDR1: Y31H, HCDR2: F54Y y HCDR3: Y99K (numeración de Kabat).

En paralelo, la optimización para aumentar la afinidad se realiza mediante el uso de oligonucleótidos mutagénicos basados en codones NNK dirigidos a las seis

CDR y se incorporan mediante mutagénesis de Kunkel en una plantilla de ADN monocatenario que contiene uracilo con las CDR seleccionadas delecionadas. La selección de variantes de Fab expresadas en fagos se realiza mediante captura-elevación (Anal Biochem. 1998 256(2): 169-77) y ELISA mediante el uso de un antígeno ECD CD19 humano biotinilado. De esta manera, se identifican las sustituciones de CDR que conducen a una mayor afinidad: HCDR1: F29I, I34Y; HCDR2: G55D, HCDR3: G100bA; LCDR1: G27aK, A34H, LCDR2: S52R, A55P, LCDR3: N93Q (numeración de Kabat) y se combinan, lo que conduce a la generación de C323.C1.

Las tres sustituciones hidrófilas descritas anteriormente (Y31H, F54Y y Y99K) se añaden a C323.C1, lo que genera un molde Fab que se usa para una ronda final de aleatorización de CDR mediante el uso de mutagénesis basada en codones NNK. Las mutaciones de CDR beneficiosas se combinan en una biblioteca que permite que todas las mutaciones beneficiosas se combinen aleatoriamente o se sometan a una mutación inversa a la secuencia de tipo salvaje. Este proceso identifica una variante de alta afinidad denominada CB3. CB3 contiene sustituciones de residuos de CDR adicionales: HCDR1: G27H, HCDR2: G50D, I53A, D55G, T56S, A57P; LCDR1: K27aH, H34A, LCDR3: L95Q (numeración Kabat).

Mediante el uso de CB3 como plantilla, se realizan cambios adicionales de CDR para revertir residuos específicos a la identidad de la línea germinal IGKV3-20 humana. Un residuo en LCDR1: N29S y cinco residuos en LCDR2: A50G, T51A, R52S, T53S, P55A se revierten simultáneamente con un impacto mínimo en las funciones del anticuerpo. Esto dio como resultado una molécula final llamada CB3f.

Se generan varias versiones de CB3f, que incluyen (1) un isotipo IgG4 que comprende una HC de la SEQ ID NO: 35 y una LC de la SEQ ID NO: 39; (2) un isotipo IgG1 que comprende una HC de la SEQ ID NO: 50 y una LC de la SEQ ID NO: 39, y (3) un anticuerpo nulo efector de IgG1 que comprende una HC de la SEQ ID NO: 52 y una LC de la SEQ ID NO: 39. A menos que se especifique lo contrario, "CB3f" se refiere al isotipo IgG4 que comprende una HC de la SEQ ID NO: 35 y una LC de la SEQ ID NO: 39.

Las **Figuras 1A-1B** muestran el perfil de hidrofobicidad superficial mejorado de CB3f en comparación con el anticuerpo parental C323. El tiempo de retención de CB3f en una columna HIC se redujo más de dos veces en comparación con el anticuerpo parental C323. Al mismo tiempo, el título de anticuerpo CB3f de una expresión transitoria de CHO ha aumentado más de dos veces en comparación con el título de

anticuerpo C323 parental.

La **Figura 2** muestra la unión mejorada a CD19 humano por los anticuerpos modificados genéticamente por afinidad CB3 y CB3f, en comparación con C323 y C323.C1, en un ensayo ELISA. El ensayo ELISA se realiza como sigue. Una placa de microtitulación de 96 pocillos se recubre durante una noche a 4 °C mediante el uso de 50 µl/pocillo de anticuerpo policlonal anti-kappa humano expresado en cabra diluido a 5 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de la incubación durante una noche, la placa se aspira y se bloquea mediante el uso de 200 µl de tampón de caseína durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lava tres veces mediante el uso de PBST (PBS con Tween 0,1 %). Los anticuerpos anti-CD19 humano se diluyen a 5 µg/ml en caseína PBS y se añaden 50 µl a cada columna de la placa bloqueada con caseína recubierta con anti-kappa humano durante 1 hora a 37 °C. La placa se lava tres veces con PBST. La proteína de dominio extracelular CD19 humana biotinilada se diluye en serie de 20 µg/ml a 9 ng/ml y se añaden 50 µl a las placas y se incuban durante 1 hora a 37 °C. La placa se lava tres veces mediante el uso de PBST y después se transfiere a un vaso de precipitados que contiene 1 litro de PBST y se incuba con agitación durante una noche (aproximadamente 16 horas) a 37 °C. Se aspira el tampón de lavado y se añaden 50 µl de conjugado de neutravidina fosfatasa alcalina diluido 1:1000 en tampón de caseína y se incuban durante 1 hora a 37 °C. La placa se lava tres veces con PBS Tween 0,1 %. Se añaden cincuenta µl de sustrato AMP-PMP diluido 1:35 en agua desionizada y se lee la absorbancia a 560 nm en un lector de placas Spectramax.

Como se muestra a continuación, CB3f muestra una unión de alta afinidad a las células CHO que expresan CD19 humano y ha adquirido inesperadamente unión a las células CHO que expresan CD19 de mono cinomolgo. CB3f tiene 92 % y 96 % de identidad con las líneas germinales IGHV1-69 e IGKV3-20 humanas, respectivamente. Por tanto, el anticuerpo anti-CD19 humano CB3f tiene una afinidad alta, hidrofobicidad baja, y porcentaje de identidad de línea germinal humana alto, es decir, riesgo de inmunogenicidad bajo.

Los anticuerpos anti-CD19 humano descritos en la presente descripción, que incluyen, pero no se limitan a, CB3f, pueden expresarse en una línea celular de mamífero como HEK293 o CHO, transfectarse de manera transitoria o estable con un sistema de expresión para secretar el anticuerpo mediante el uso de una relación de vector HC:LC predeterminada óptima o un sistema de vector único que codifica tanto las HC como LC. Los medios clarificados, en los que se ha secretado el anticuerpo,

pueden purificarse mediante el uso de las técnicas comúnmente usadas. La pureza del anticuerpo, después de estos pasos de cromatografía, puede alcanzar un valor superior a 99,0 % (monómero).

Ejemplo 2. Caracterización de los anticuerpos anti-CD19 humano.

Afinidad de unión a CD19

Las afinidades de unión en equilibrio de fase de solución del mAb anti-CD19 humano CB3f a CD19 humano unido a membrana y CD19 de mono cinomolgo expresado de manera estable en células CHO se miden mediante un ensayo de titulación en equilibrio de solución MSD (MSD-SET) a 37 °C. Además, la afinidad monovalente y la cinética de la unión del fragmento Fab de CB3f a CD19 se miden mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) a 37 °C.

Se usa un instrumento MSD SI6000 (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) para leer las placas MSD. Las placas de ensayo de MSD se preparan como sigue. Una placa de 96 pocillos de matriz múltiple (Meso Scale Discovery, P/N L15XA-3) se recubre durante una noche a 4 °C con una solución de 1 µg/ml de un anticuerpo de captura anti Fc humano expresado en cabra (Jackson ImmunoResearch, P/N 109-005-098) en PBS. Las placas se lavan 3 veces en TBS + Tween-20 0,1 % (TBST) después del recubrimiento.

Las células CHO que expresan de manera estable células CD19 humanas y de mono cinomolgo se fijan en paraformaldehído 1 % en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. El paraformaldehído se elimina mediante lavado con PBS y las células se almacenan a 4 °C en Bloqueador A 1 % (diluido a partir de Bloqueador A 3 %, Meso Scale Discovery, P/N R93AA-1) con azida sódica 0,05 % (p/v).

Para la medición de la afinidad de CD19 humano, las muestras se preparan por duplicado con una concentración de anticuerpo fija de 400 pM, 80 pM, 16 pM y 3,2 pM. Para la medición de la afinidad de CD19 de mono cinomolgo, las muestras se preparan por duplicado con una concentración de anticuerpo fija de 10 nM, 2 nM, 400 pM y 80 pM. Las células CHO CD19 humano fijadas se sedimentan mediante centrifugación y se resuspenden en una solución de Bloqueador A 3 % a 22×10^6 células/ml. Las células CHO CD19 de mono cinomolgo fijadas se sedimentan mediante centrifugación y se resuspenden en una solución de Bloqueador A 3 % a 200×10^6 células/ml. Las células se diluyen en serie 2,5 veces en una placa de 96 pocillos de fondo cónico en Bloqueador A 3 % hasta aproximadamente 900 células/ml para CD19 humano y 8400 células/ml para CD19 de mono cinomolgo para un total de 12

diluciones de células cada una. Estos se mezclan 1:1 con diluciones de anticuerpos preparadas previamente. Para CD19 humano, las concentraciones finales de anticuerpos son 200 pM, 40 pM, 8 pM y 1,6 pM, y las diluciones celulares finales de 11×10^6 células/ml hasta aproximadamente 450 células/ml. Para CD19 de mono cinomolgo, las concentraciones finales de anticuerpo son 5 nM, 1 nM, 200 pM y 40 pM, y las diluciones celulares finales de 100×10^6 células/ml hasta aproximadamente 4200 células/ml. La placa se incuba en un agitador de placas a 37 °C durante 3-4 días para CD19 humano y 2 días para CD19 de mono cinomolgo para permitir que la unión alcance el equilibrio.

Después de la incubación, las células se sedimentan mediante centrifugación. Se transfieren cien microlitros del sobrenadante clarificado de la placa a la placa MSD preparada y se incuban en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después de la incubación, la placa se lava 3 veces con TBST, después se añaden a todos los pocillos 100 µl de anticuerpo primario anti IgG humana expresado en cabra biotinilado 1 µg/ml (Southern Biotech, Catálogo 2010-08) en Bloqueador A 1 %. Se incuba en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 60 minutos. La placa se lavó 3 veces con TBST, luego se añadieron a todos los pocillos 100 µl de estreptavidina SULFO-TAG 1 µg/ml (Meso Scale Discovery, P/N R32AD-1) en Bloqueador A 1 %. Este se incubó en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 60 minutos. La placa se lava 3 veces con TBST, después se añade tampón de lectura T 1X (Meso Scale Discovery, P/NR92TC-1) inmediatamente antes de leer la placa. La constante de disociación (K_D) y un multiplicador mínimo común (LCM) para tener en cuenta las concentraciones de antígenos desconocidos en las células se ajustan globalmente a partir de los datos de MSD-SET a una ecuación de unión de equilibrio (véase Darling y Brault, 2005, Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions. Assay and Drug Development Technologies 2: 647–657) mediante el uso de regresión no lineal en GraphPad Prism.

El instrumento Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences), los reactivos y el programa de evaluación Biacore T200 Ver 3.1 se usaron para el análisis de resonancia de plasmón superficial de la unión de CD19 humano, ratón y mono cinomolgo al fragmento Fab de CB3f. Las proteínas Fc CD19 recombinantes se adquieren de R&D Systems. Se usa un chip sensor de proteína A (chip de proteína A GE P/N 2912755). El tampón de corrida es HBS-EP+ 1X (Teknova P/N H8022) y la temperatura de corrida es de 37 °C.

Las proteínas de fusión Fc CD19 se diluyen en tampón de corrida 3 µg/ml, y

aproximadamente 60 RU de cada proteína humana, de mono cinomolgo y de ratón se capturan en las celdas de flujo (Fc) 2, 3 y 4, respectivamente. El fragmento Fab de CB3f se diluye a 1000 nM en tampón de corrida y después se diluye en serie 5 veces en tampón de corrida a 1,6 nM para un total de 5 diluciones. Se inyecta Fab o tampón en blanco a 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 300 segundos seguido de una fase de disociación de 900 segundos. La regeneración se realiza tras inyectar glicina 10 mM pH 1,5 durante 30 segundos a 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ sobre todas las Fc. Los datos sustraídos de referencia se recogen como Fc2-Fc1, Fc3-Fc1 y Fc4-Fc1, y después los datos sustraídos de referencia se sustraen en blanco. La constante de asociación (k_{on}) y la constante de disociación (k_{off}) se ajustan mediante el uso del modelo “Unión 1:1”. La afinidad (K_{D}) se calculó a partir de la cinética de unión de acuerdo con la relación $K_{\text{D}} = K_{\text{off}}/K_{\text{on}}$.

CB3f se une a CD19 humano y de mono cinomolgo expresados en células CHO con una afinidad (K_{D}) de 3,35 pM y 45,2 pM, respectivamente (Tabla 1).

El fragmento Fab de CB3f se une a CD19 humano con una constante de asociación (k_{on}) de $3,20 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, una constante de disociación (k_{off}) de $2,35 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, y una afinidad (K_{D}) de 76,8 pM (Tabla 2). El fragmento Fab de CB3f se une a CD19 de mono cinomolgo con una constante de asociación (k_{on}) de $1,04 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, una constante de disociación (k_{off}) de $9,78 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, y una afinidad (K_{D}) de 94,5 nM (Tabla 2). No se observa unión a CD19 de ratón a una concentración de Fab 1 μM .

Tabla 1: Unión de CB3f a células CHO fijadas que expresan CD19 humano o de mono cinomolgo *in vitro*.

[Medido por MSD-SET a 37 °C. Los resultados se informan como la media geométrica de la K_{D} de 3 réplicas independientes. La estimación del error se calcula como media geométrica x desviación estándar $\log_{10} K_{\text{D}} \times \ln 10$]

Especie	afinidad de mAb (pM)
CD19 humano	$3,35 \pm 0,56$
CD19 de mono cinomolgo	$45,2 \pm 2,8$

Tabla 2: Parámetros de unión del fragmento Fab de CB3f a proteínas de fusión Fc CD19 humano, de mono cinomolgo y de ratón *in vitro*.

[Medido por resonancia de plasmón superficial (SPR) a 37 °C. Los resultados se informan como la media $\pm$ desviación estándar de 3 réplicas independientes.]

Especie	Constante de asociación (k_{on}) de Fab ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1} \times 10^6$)	Constante de disociación (k_{off}) de Fab ($\text{s}^{-1} \times 10^{-4}$)	Afinidad (K_{D}) de Fab (pM)
CD19 humano	$3,20 \pm 1,15$	$2,35 \pm 0,37$	$76,8 \pm 16,0$
CD19 de mono cinomolgo	$1,04 \pm 0,03$	978 ± 79	$94\,500 \pm 7900$
CD19 de ratón	No se observó unión a una concentración de Fab de 1 μM		

Estabilidad

La estabilidad de CB3f se evalúa a una concentración alta (aproximadamente 100 mg/ml) en tampón de histidina 5 mM (pH 6,0) con excipientes. Las muestras concentradas se incuban durante un período de 4 semanas a 5 °C y 35 °C. Después de la incubación, las muestras se analizan para determinar el porcentaje de peso molecular alto (% HMW) con cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), la fragmentación por electroforesis capilar (CE-SDS) y la modificación química (por ejemplo, desamidación, isomerización u oxidación) por mapeo de péptidos LC-MS. Después de 4 semanas a 35 °C, CB3f exhibe $\Delta\%$ HMW de 0,5 %, $\Delta\%$ de fragmentos de 0,6 % y ninguna modificación química de CDR mayor que 0,2 %.

La estabilidad de congelación/descongelación en las mismas condiciones se evalúa mediante el uso de un ciclo de temperatura controlada lento y repetido 3 veces que imita las condiciones de congelación/descongelación de grandes volúmenes de sustancia farmacológica a granel colocada a -70 °C. CB3f exhibe $\Delta\%$ HMW de 1,9 % medido por SEC después de los 3 ciclos de congelación-descongelación. Otros excipientes pueden reducir aún más el % de crecimiento de HMW (datos no mostrados).

Estos resultados indican que CB3f posee buenas estabilidades físicas y químicas.

Solubilidad

La solubilidad se evalúa tras concentrar 100 mg de CB3f con un filtro centrífugo de corte de peso molecular de 30 kDa (por ejemplo, filtros Amicon U.C., Millipore, núm. de catálogo UFC903024) hasta un volumen de aproximadamente 0,5 ml. La concentración final de la muestra se mide mediante absorbancia UV a 280 nm mediante el uso de un espectrofotómetro Solo VPE (C Technologies, Inc).

CB3f muestra una solubilidad mayor o igual a 183 mg/ml en tampón histidina 5 mM pH 6 y mayor o igual a 170 mg/ml en PBS (solución salina tamponada con fosfato) pH 7,4. Estos resultados indican que CB3f presenta una alta solubilidad.

Viscosidad

La viscosidad de CB3f se analiza a 15 °C a una concentración aproximada de 125 mg/ml en histidina 5 mM a pH 6,0 con diferentes excipientes. Las mediciones de viscosidad se realizan con un VROC Initium (RheoSense). CB3f mostró viscosidades de 14,2 cP a 131 mg/ml en histidina 5 mM a pH 6 + manitol 280 mM, 9,5 cP en histidina 5 mM a pH 6,0 + cloruro de sodio 150 mM y viscosidad 6,1 cP en histidina 5 mM pH 6,0 + arginina 280 mM. Estos resultados indican que CB3f presenta una

viscosidad baja, lo que podría permitir una dosificación de alta concentración.

Farmacocinética (PK)

Las propiedades PK de CB3f se estudian en monos cinomolgos tras una administración única subcutánea de 0,03, 0,3, 1 y 10 mg/kg de CB3f, o una administración única de un bolo intravenoso de 1 mg/kg de CB3f. CB3f muestra PK lineal en el intervalo de dosis subcutáneo examinado, con la vida media terminal ($T_{1/2}$) que varía de 182 a 301 horas. La $T_{1/2}$ después de una administración única de un bolo intravenoso de 1 mg/kg de CB3f es de 324 horas.

Se ha informado que obexelimab tiene una $T_{1/2}$ promedio de $3,5 \pm 1,0$ días, que equivale a 60-108 horas (Jaraczewska-Baumann, y otros, European League Against Rheumatism (EULAR) 2015 Annual Meeting Poster: *A Phase 1b/2a Study of the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of XmAb@5871 in Patients with Rheumatoid Arthritis*, 12 de junio de 2015, disponible en <https://investors.xencor.com/static-files/0017dcf1-deb2-46eb-93ff-90ba164ec50c>). Por tanto, CB3f tiene una $T_{1/2}$ mejor que obexelimab.

Ejemplo 3. Caracterización funcional de los anticuerpos anti-CD19 humano *in vitro*.

Inhibición de la proliferación de células B por el mAb anti-CD19 humano CB3f in vitro.

La capacidad del mAb anti-CD19 humano CB3f para inhibir la proliferación de células B humanas primarias se evalúa en un ensayo de proliferación de células B *in vitro*.

Las células B humanas primarias se aíslan de PBMC de donantes sanos mediante selección negativa mediante el uso de un kit de aislamiento de células B (Stemcell Technologies). Las células B primarias humanas se resuspenden a 1×10^6 células/ml y se cultivan a 37 °C en placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo en U en medio completo (RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal 10 %, MEM 1x-aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, solución de penicilina-estreptomicina 1x (todos a partir de Corning) y Glutamax (Gibco) 1x, β -mercaptoetanol 0,1 % (Life Technologies). Las células se pretrataron con anticuerpo anti-CD19 humano durante 1 hora y se estimularon con IgM anti-humana expresada en ratón (2 μ g/ml-Southern Biotech), más IgG anti-ratón expresada en conejo (12 μ g/ml-Thermo Fisher) durante 2 días a 37 ° y CO₂ 5 %. Después, las células se pulsan con [³H]-timidina (1 μ Ci de timidina/pocillo, PerkinElmer, Boston, MA) durante 18 horas de

cultivo celular. El nivel de incorporación de [H^3]-timidina se mide mediante un contador de microplacas 2450 (MicroBeta² número de serie: 5129186, PerkinElmer, Boston, MA) y se expresa como conteo de células por minuto (c.c.p.m).

El mAb anti-CD19 humano CB3f inhibe la proliferación de células B humanas primarias de una manera dependiente de la dosis, mientras que el control de isotipo no demuestra inhibición a ninguna concentración evaluada (**Figura 3**). La función inhibidora de CB3f se evalúa mediante el uso de células B obtenidas a partir de 12 donantes diferentes, y la IC₅₀ promedio para CB3f es 0,007 nM (**Tabla 3**). Los datos muestran que el mAb anti-CD19 humano CB3f puede inhibir la proliferación de células B humanas primarias de una manera dependiente de la dosis, mientras que la proliferación de las células B no se afecta por el anticuerpo de control de isotipo.

Tabla 3. Inhibición de la proliferación de células B primarias por el mAb anti-CD19 humano CB3f

	Valores de IC ₅₀ (nM)
Donante 1	0,006
Donante 2	0,009
Donante 3	0,003
Donante 4	0,006
Donante 5	0,004
Donante 6	0,003
Donante 7	0,003
Donante 8	0,005
Donante 9	0,005
Donante 10	0,028
Donante 11	0,004
Donante 12	0,005
Promedio	0,007

Inhibición de la activación de células B en sangre total humana in vitro

La capacidad del mAb anti-CD19 humano CB3f para inhibir la activación de células B humanas primarias en sangre total se evalúa en un ensayo de activación de sangre total *in vitro*.

La sangre total humana tratada con EDTA (donantes sanos, TSRI Normal Blood Donor Services, San Diego, CA) se cultiva en placas de poliestireno de 96 pocillos, con fondo en U y se preincuba con CB3f o el anticuerpo de control de isotipo durante 30 minutos a una hora a 37 °C y CO₂ 5 %. Se usan 7 nM de cada anticuerpo como la concentración más alta con una dilución de 4 veces y una titulación de 12 puntos en medio completo (RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal 10 %, MEM 1x-aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, solución de penicilina-estreptomicina 1x (todos a partir de Corning) y Glutamax (Gibco) 1x, β-mercaptoetanol

0,1 % (Life Technologies). Se estimula la sangre total con 2,5 µg/ml de ligando TLR9 durante 24 horas a 37 °C y CO₂ 5 % (CpG ODN 7909 (InvivoGen, San Diego, CA)). El perfil de activación de las células B se mide mediante citometría de flujo y los datos se analizan mediante el uso del programa FlowJo.

La citometría de flujo se realiza como sigue. La sangre total humana tratada y activada se lisa con tampón de lisis de RBC (Fisherscientific, Estados Unidos). Las células se tiñen con la combinación apropiada de anticuerpos conjugados con fluorocromo durante 30 min a 4 °C para identificar los marcadores de activación de las células B: CD69 BV605 (núm. de cat. 310938) de BioLegend. Las células también se tiñen con CD3 FITC (núm. de cat. 300306), CD19 APC (núm. de cat. 363006), todos de BioLegend, CD20 PerCP-Cy5,5 (núm. de cat. 560736) de BD Pharminogen y tinte de viabilidad fijable eFluor™ 780 (eBioscience). Para cada muestra se analizan al menos 25 000-50 000 eventos activados en células vivas. Las muestras se adquieren en un BD Fortessa X-20 y los resultados se analizan mediante el uso del programa FlowJo.

El mAb anti-CD19 humano CB3f inhibe la activación de células B humanas primarias de una manera dependiente de la dosis, que se mide mediante la reducción de las células B CD69+. El ensayo se realiza mediante el uso de sangre obtenida de tres donantes diferentes y los resultados representativos se muestran en La **Figura 4**. La IC₅₀ promedio para CB3f en este ensayo es 0,008 nM (Tabla 4). El anticuerpo de control de isotipo no demostró inhibición de la expresión de CD69 a ninguna concentración evaluada. Los datos muestran que el mAb anti-CD19 humano CB3f puede inhibir la activación de células B humanas primarias en sangre total de una manera dependiente de la dosis, mientras que la activación de células B no se afecta por el anticuerpo de control de isotipo.

Tabla 4. Inhibición de la activación de células B en sangre total por el mAb anti-CD19 humano CB3f

	Valores de IC ₅₀ (nM)
Donante 1	0,015
Donante 2	0,0006
Donante 3	0,008
Promedio	0,008

Inhibición de la diferenciación de células B en plasmablastos in vitro

Las células B humanas de memoria se aíslan de PBMC de donantes sanos mediante el uso de un kit de aislamiento de células B de memoria (Miltenyi Biotec).

Las células B de memoria primarias humanas se resuspendieron a 1×10^6 células/ml y se cultivaron a 37 °C en placas de poliestireno de 96 pocillos, de fondo en U en medio completo (RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal 10 %, MEM 1x- aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, solución de penicilina-estreptomicina 1x (todos a partir de Corning) y Glutamax (Gibco) 1x, β -mercaptoetanol 0,1 % (Life Technologies). Las células se pretratan con mAb anti-CD19 humano CB3f durante 1 hora y se estimulan con anti-CD40 50 ng/ml, BAFF 200 ng/ml, IL-2 1 ng/ml, IL-21 100 ng/ml (todos de R&D) durante 5 días. Las células se lavan y se tiñen con la combinación apropiada de anticuerpos conjugados con fluorocromo durante 30 min a 4 °C para identificar la diferenciación de las células B de memoria en los plasmablastos: CD38 PE, CD3 FITC (núm. de cat. 300306), CD19 APC (núm. de cat. 363006) todos de BioLegend, CD20 PerCP-Cy5.5 (núm. de cat. 560736) de BD Pharmingen y tinte de viabilidad fijable eFluor™ 780, eBioscience. Para cada muestra se analizan al menos 25 000-50 000 eventos activados en células vivas. Las muestras se adquieren en un BD Fortessa X-20 y los resultados se analizan mediante el uso del programa FLOWJo. El porcentaje de plasmablastos se define como % de células B CD38^{brillantes}/CD20^{bajas}.

El mAb anti-CD19 humano CB3f inhibe la diferenciación de células B de memoria primaria humana en plasmablastos de una manera dependiente de la dosis (**Figura 5**). El experimento se repite tres veces y se muestran los datos representativos. El anticuerpo de control de isotipo no demuestra inhibición de la diferenciación de plasmablastos a ninguna concentración evaluada. Los datos muestran que CB3f puede inhibir la diferenciación de células B de memoria humana primaria en plasmablastos de una manera dependiente de la dosis, mientras que la diferenciación no se afecta por el anticuerpo de control de isotipo.

El mAb CD19 CB3f es un mAb no depletante y carece de actividad en los ensayos de CDC y ADCC in vitro.

El mAb anti-CD19 humano CB3f es un anticuerpo inhibidor de células B, que está diseñado para inhibir la función de las células B sin causar la depleción de las células B. Se realizan ensayos *in vitro* para confirmar que CB3f carece de actividades de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), lo que implica que no tiene una función depletante.

La línea celular Wil2-s que expresa CD19 y CD20 se usa como células diana, y las líneas celulares Jurkat que expresan Fc γ RIIIa funcional (V158)-NFAT-Luc (Eli Lilly and Company) se usan como línea celular efectora. Se evalúa CB3f y se usa como

control positivo un anticuerpo IgG1 que es un inductor potente conocido de ADCC y CDC.

CB3f se diluye en serie por triplicado a partir de concentraciones de prueba de 10 µg/ml y 1 µg/ml para los ensayos CDC y ADCC, respectivamente. Se añaden 50 µl/pocillo de compuesto de prueba o tampón de ensayo a una placa de 96 pocillos (Costar 3916). Las células WIL2-s se diluyen a una concentración de 1×10^6 células/ml y se añaden 50 µl/pocillo a la placa. Las placas CDC y ADCC se incuban durante 1 hora a 37 °C. A continuación, las células Jurkat V158 se diluyeron a una concentración de 3×10^6 células/ml y se añadieron 50 µl/pocillo para la placa de ADCC, o 50 µl/pocillo de complemento pre-diluido a partir de suero humano (Quidel A113) para la placa de CDC. Las placas de CDC se incuban a 37 °C durante 2 horas seguido de la adición de Cell-Titre Glo (Promega G7571) 100 µl/pocillo. Las placas de ADCC se incuban a 37 °C durante 4 horas seguido de la adición de ONE-Glo (Promega E8130) 100 µl/pocillo. El contenido de las placas se mezcla mediante el uso de un agitador de placas a baja velocidad, y la señal de luminiscencia se lee en un lector de placas multimodo Envision 11 mediante el uso de una integración de 0,2 cps. Los datos se analizan con GraphPad Prism v8.2.

Los resultados de los ensayos de CDC y ADCC se muestran en las **Figuras 6A-6B** (resultados representativos de tres corridas de placas independientes). Todos los niveles de respuesta se clasifican en relación con el anticuerpo IgG1 control positivo. El mAb anti-CD19 humano CB3f no tiene actividad CDC (**Figura 6A**) ni actividad ADCC (**Figura 6B**) a las concentraciones indicadas.

Especificidad de la unión de mAb anti-CD19 humano a células B en sangre total humana.

El mAb anti-CD19 humano CB3f es un anticuerpo inhibidor de células B, que actúa mediante la supresión de la función de las células B. Obexelimab es un anticuerpo que se une tanto a CD19 como a FcγRIIb. Sin embargo, la unión de alta afinidad de obexelimab a FcγRIIb podría conducir a la unión a otros tipos de células de una manera independiente de CD19. Por tanto, la especificidad de unión de obexelimab y el mAb anti-CD19 humano CB3f se compara mediante el uso de un ensayo de unión en sangre total humana.

La sangre total humana tratada con EDTA (donantes sanos, TSRI Normal Blood Donor Services, San Diego, CA) se siembra en placas de poliestireno de 96 pocillos y se tiñe con diferentes concentraciones de CB3f conjugado Alexa Flour® 647, conjugado Alexa Flour® 647 y control de isotipo conjugado Alexa Flour® 647 más una

combinación apropiada de anticuerpos extracelulares conjugados con fluorocromo para detectar la población de linfocitos/granulocitos. 7 nM de cada anticuerpo se usa como la concentración más alta con una dilución de 3 veces y una titulación de 8 puntos en DPBS 1x sin Ca^{2+} , ni Mg^{2+} (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) complementada con suero bovino fetal (FBS- inactivado con calor) 2 %, ambos a partir de Corning®. El cóctel incluye CD20 PerCP-Cy5.5 (núm. de cat. 560736), CD45 BV421 (núm. de cat. 563879), CD66 FITC (núm. de cat. 555724) todos de BD Biosciences. CD3 BV605 (núm. de cat. 317322), CD11b PE-Cy7 (núm. de cat. 101216) todos de BioLegend y tinte de viabilidad fijable eFluor™ 780, (núm. de cat. 65-0865-14) de eBioscience. La sangre total más los anticuerpos se tiñen durante 30 min a 4 °C en la oscuridad. Las células muertas se excluyen mediante el tinte de viabilidad y se analizan al menos 25 000-50 000 eventos activados en células vivas. Las muestras se adquieren en BD Fortessa X-20 y los resultados se analizan mediante el uso del programa FlowJo.

El análisis de citometría de flujo demuestra que CB3f se une exclusivamente a células B en sangre total humana en todas las concentraciones evaluadas (**Figura 7**). Obexelimab muestra unión a células B humanas, así como a una población de células negativas a CD20 (es decir, células no B), que expresan CD66 y CD11b y, por tanto, se identifican como neutrófilos (**Figura 7**). Por lo tanto, los datos indican que el mAb anti-CD19 humano CB3f tiene una unión altamente específica a las células B humanas en sangre total humana, mientras que obexelimab muestra una unión no específica a los neutrófilos humanos además de la unión a las células B. Dado que los neutrófilos son el tipo de glóbulos blancos más abundante en humanos, la unión inespecífica a los neutrófilos podría explicar la vida media corta de obexelimab observada en pacientes humanos. El experimento se repite mediante el uso de sangre de cuatro donantes diferentes, los resultados representativos se muestran en la **Figura 7**.

Ensayo de apoptosis in vitro.

Como se describió anteriormente, se demostró que obexelimab reduce el conteo de células B en pacientes humanos durante los estudios clínicos (Jaraczewska-Baumann, y otros, EULAR 2015 Annual Meeting Poster: *A Phase 1b/2a Study of the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of XmAb®5871 in Patients with Rheumatoid Arthritis*, 12 de junio de 2015).

La capacidad del mAb anti-CD19 humano CB3f y de obexelimab para inducir la apoptosis de células B humanas primarias se evalúa mediante el uso de un ensayo de apoptosis de células B *in vitro*. Las células B primarias humanas se aíslan de PBMC

de donantes sanos por selección negativa mediante el uso del kit de aislamiento de células B (Stemcell Technologies). Las células B primarias humanas se resuspendieron a 1×10^6 células/ml y se cultivaron a 37 °C en placas de poliestireno de 96 pocillos, de fondo en U en medio completo (RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal 10 %, MEM 1x-aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, solución de penicilina-estreptomicina 1x (todos a partir de Corning) y Glutamax (Gibco) 1x, β -mercaptoetanol 0,1 % (Life Technologies). Las células se tratan con las concentraciones indicadas de CB3f, obexilimab o un anticuerpo de control de isotipo durante 24 horas a 37 °C y CO₂ 5 %. La apoptosis de las células B se mide por citometría de flujo mediante el uso de tinción con anexina V en combinación con un tinte de viabilidad. Las células se tiñen con la combinación apropiada de anticuerpos conjugados con fluorocromo durante 30 min a 4 °C para identificar marcadores de activación de células B: CD19 APC (Biolegend), CD20 PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen), Anexina V (Invitrogen) y tinte de viabilidad fijable eFluor™ 780 (eBioscience). Las células apoptóticas se definen como células de anexina V⁺ vivas. Las muestras se adquieren en un BD Fortessa X-20 y los resultados se analizan mediante el uso del programa FlowJo.

El experimento se repite mediante el uso de las células B obtenidas de tres donantes diferentes y los datos representativos se muestran en la **Figura 8**. Obexilimab induce apoptosis de las células B de una manera dependiente de la dosis (**Figura 8**), lo que puede explicar la reducción de los conteos de células B en pacientes humanos observada en los estudios clínicos. Por el contrario, CB3f induce muy poca o ninguna apoptosis de las células B humanas en comparación con el control de isotipo (**Figura 8**). Los datos indican que, a diferencia del obexilimab, el mAb anti-CD19 humano CB3f no induce apoptosis de las células B humanas primarias *ex vivo*, lo que sugiere un mecanismo de acción diferente para CB3f. Estos datos indican además que el mAb anti-CD19 humano CB3f actúa mediante la inhibición de la función de las células B sin depletar las células B o mediante la reducción significativa del número de células B.

Ejemplo 4. Caracterización funcional de los anticuerpos anti-CD19 humano *in vivo*.

Se alojaron 3 ratones NSG hembras NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, JAX Labs, núm. de Stock 05557) a 72 °C bajo un ciclo de luz: oscuridad de 12 horas y se les permitió alimento y agua *ad libitum* (n = 33). Se aíslan células mononucleares de

sangre periférica humana (PBMC) de tubos LRS obtenidos del Banco de Sangre de San Diego (San Diego CA) mediante el uso de tubos de preparación SepMate 50 Ficol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (StemCell Technologies, Vancouver, BC). Las PBMC recién aisladas se suspenden en PBS a $1,2 \times 10^8$ células/ml y los ratones se injertan con 100 μ l de suspensión de PBMC por vía intravenosa el día 0 ($1,2 \times 10^7$ /ratón, $n = 29$); a 4 ratones no se les administran PBMC como controles no injertados. El día 1, los ratones se dividen en 3 grupos de pesos pareados y se dosifican con control de isotipo IgG4 humano o CB3f a 0,01 o 1,0 mg/kg por vía subcutánea (200 μ l/ratón, $n = 10$, 10 y 9 respectivamente). La dosificación continúa una vez a la semana durante el resto del experimento. Los controles de salud y las mediciones del peso corporal se realizan de forma rutinaria. La sangre se recoge mediante un corte de la cola en tubos capilares recubiertos de heparina los días 6 y 10. El día 15, la sangre se recoge mediante punción cardíaca bajo anestesia con isoflurano en tubos con EDTA para análisis FACS y se aclara por centrifugación para los análisis de plasma. Los bazo se recogen y procesan en suspensiones de células únicas para análisis FACS.

Los ratones se pesan en una campana BSL2 y se evalúan los signos clínicos de malestar 2-3 veces por semana. Los signos clínicos comunes a este modelo son cabello desaliñado, cuerpo encorvado, emaciación y dificultad para respirar o moverse. El cambio de peso corporal se calcula como un porcentaje de su peso inicial: $(\text{peso del día } (x) / \text{peso del día } 0) \times 100$.

La sangre de la punción cardíaca se recoge en tubos recubiertos con EDTA, se aclara por centrifugación y el plasma resultante se almacena a -80°C para su procesamiento futuro. Los niveles de IgM en plasma se miden mediante el uso del panel Mesoscale Discovery Human Isotyping (Rockville Maryland) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se usan suspensiones de células únicas de bazo de ratón para el análisis por FACS. Las células se cultivan en placas de 96 pocillos y se tiñen con la combinación apropiada de anticuerpos conjugados con fluorocromo durante 30 min a 4°C para identificar los marcadores de activación de células B: hCD45-BV421, CD86 BV650, CD3 APC, CD19 FTIC, todos de BioLegend, CD20 PerCP-Cy5.5 y tinte de viabilidad fijable eFluor™ 780. Para cada muestra se analizan al menos 250 000 eventos activados en células vivas. Las muestras se adquieren en un BD Fortessa X-20 y los resultados se analizan mediante el uso del programa FlowJo.

Los datos se grafican y las estadísticas se calculan mediante el uso del programa

Prism (GraphPad, San Diego, CA). Las diferencias de peso entre grupos se determinan mediante RM-ANOVA bidireccional con la prueba post hoc de Tukey. Las diferencias en los niveles plasmáticos de IgM se determinan mediante ANOVA de 1 vía con la prueba post hoc de Tukey y se consideran significativas si $p < 0,05$.

La inyección de PBMC humanas en ratones NSG da como resultado un injerto marcado de células B funcionales según se mide mediante la secreción de IgM humana en la periferia. La IgM humana en los animales tratados con control de isotipo IgG4 aumenta rápidamente desde no detectable hasta $1,3 \pm 0,1$ y $48,8 \pm 6,2$ $\mu\text{g/ml}$ en los días 6 y 10 después de los injertos, respectivamente. CB3f dosificado a 0,01 y 1,0 mg/kg/semana atenúa significativamente la secreción de IgM en 60 % y 78 % en el día 6 como se muestra en las **Figuras 9A-9B** ($p < 0,01$ para ambas dosis). También se observa una reducción de 57 % en la IgM circulante el día 10 con la dosis de CB3f de 1,0 mg/kg/semana ($p < 0,05$). Los pesos del ratón no son diferentes entre los grupos, ni ningún ratón muestra signos de GvHD.

La activación de células B humanas en ratones NSG se mide mediante la expresión del marcador de activación CD86. Como se demuestra en la **Figura 10**, el tratamiento con mAb anti-CD19 humano CB3f reduce la expresión de CD86 en células B humanas de una manera dependiente de la dosis.

El tratamiento con CB3f provoca una reducción leve del porcentaje de células B esplénicas, lo que probablemente se deba a la reducción de la activación y la proliferación de las células B. A pesar de este hecho, las células B están presentes en los bazo en números mayoritariamente inalterados (> 50 % de esplenocitos), lo que indica la naturaleza no depletante del mAb anti-CD19 humano CB3f (**Figura 11**).

Ejemplo 5. Internalización de los anticuerpos anti-CD19 humano en células B humanas primarias

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se recogen de LRS-WBC de voluntarios sanos mediante el uso del método de centrifugación en gradiente de densidad estándar. Las células B primarias humanas se aíslan de PBMC de donantes sanos por selección negativa mediante el uso de un kit de aislamiento de células B. Para el estudio de la internalización, las células B se resuspenden a 4×10^6 células/ml y se añaden 50 μl a cada pocillo en una placa de 96 pocillos. Un fragmento de Fcy de Ig humana dirigido a F(ab')₂ marcado (F(ab')₂-TAMRA-QSY7) se usa como sonda para rastrear la internalización. El anticuerpo de prueba se incuba con una sonda a 4 °C durante 30 minutos para formar un complejo y se añaden 50 μl a las

células B de cada pocillo. La concentración final del anticuerpo de prueba es 2 µg/ml. Las células se incuban durante 24 h a 37 °C en una incubadora de CO₂. Después, las células se lavan dos veces con FBS PBS 2 % y se resuspenden en FBS PBS 2 % con un tinte de viabilidad (SYTOX Green, Invitrogen). Los datos se recogen en un BD Fortessa X-20 y se analizan en FlowJo.

Tanto el mAb1 anti-CD19 humano (CB3f) como el mAb2 anti-CD19 humano (C323.C1) demuestran internalización en células B humanas primarias a las 24 horas (**Figura 12**). Se usa un anticuerpo de control de isotipo nulo efector de IgG1 como control negativo y no muestra ninguna internalización significativa como lo demuestra el porcentaje bajo de células TAMRA+ (**Figura 12**). Un mAb IgG4 de control positivo demuestra una internalización comparable a los mAb anti-CD19 humanos evaluados (**Figura 12**).

Ejemplo 6. Comparación de la eficacia de un anticuerpo sustituto de anti-CD19 de ratón no depletante con un anticuerpo sustituto de anti-CD20 de ratón depletante de las células B en modelos animales

Eficacia de un anticuerpo sustituto de CD19 no depletante y un anticuerpo sustituto de CD20 depletante de las células B en un modelo CIA de ratón in vivo

En este estudio, se evaluaron un anticuerpo sustituto anti-CD19 de ratón no depletante (Ab sustituto de CD19) y un anticuerpo sustituto de CD20 anti-ratón depletante de las células B (Ab sustituto de CD20) junto con un anticuerpo de control de isotipo en una artritis inducida por colágeno de ratón (CIA) en un modo de enfermedad semiestablecido (es decir, el anticuerpo se introdujo después de la inducción de la enfermedad pero antes de que los animales desarrollaran cualquier puntuación clínica detectable).

Los ratones tratados con control de isotipo inmunizados con colágeno y adyuvante completo de Freund (CFA) desarrollaron signos observables de inflamación articular a partir del día 25, mientras que los ratones no enfermos tratados con isotipo no presentaron inflamación articular observable durante todo el estudio (**Figura 13A**). El tratamiento que comenzó el día 19 con el Ab sustituto de CD20 (10 mg/kg SC, una vez a la semana) mejoró la puntuación clínica promedio, mientras que el Ab sustituto de CD19 (5 mg/kg SC, dos veces por semana) redujo aún más las puntuaciones clínicas promedio (**Figura 13A**). El Ab sustituto de CD20 no redujo significativamente el AUC de la puntuación clínica en comparación con el control de isotipo (**Figura 13B**). Por otro lado, el Ab sustituto de CD19 redujo significativamente el AUC de la puntuación clínica en comparación con el control de isotipo y el Ab sustituto de CD20

(Figura 13B). Estos resultados sugieren que el Ab sustituto de CD19 puede reducir la gravedad de la enfermedad más que el Ab sustituto de CD20 según lo evaluado por el AUC de la puntuación clínica en el modelo CIA de artritis de ratón realizado en modo semiestablecido.

Eficacia del Ab sustituto de CD19 no depletante y el Ab sustituto de CD20 depletante de las células B en un modelo de diabetes tipo 1 en ratón NOD in vivo.

La cepa de ratón NOD/ShiLtJ (comúnmente llamada diabético no obeso) es un modelo poligénico para la diabetes tipo 1 autoinmunitaria (T1D). La diabetes en ratones NOD se caracteriza por hiperglucemia e insulinitis, una infiltración leucocítica de los islotes pancreáticos. La prevalencia de la enfermedad es más alta en ratones hembra.

En este estudio, el Ab sustituto de CD19 no depletante se evaluó junto con un Ab sustituto de CD20 depletante en el modelo de diabetes tipo 1 en ratón NOD en un modo semiterapéutico de tratamiento de la enfermedad (es decir, el anticuerpo se introdujo justo antes de que los animales control comenzaran desarrollar puntuación clínica).

Se dejaron sin tratar ratones hembra NOD-LTJ, se dosificaron con 5 mg/kg/BIW del Ab sustituto de CD19, o del Ab sustituto de CD20 a partir de las 12 semanas de edad. Todos los ratones se evaluaron semanalmente para determinar la glucosa en sangre mediante el uso de un glucómetro Accu Check Aviva (Roche núm. de cat. 06870287001) y tiras reactivas (Roche núm. de cat. 06908373001, núm. de lote 497064). Los ratones con niveles de glucosa en sangre por encima de 240 mg/dl se consideraron diabéticos. Los ratones no tratados desarrollaron diabetes a partir de las 14 semanas de edad. El tratamiento con el Ab sustituto de CD20 (5 mg/kg SC, dos veces por semana) demostró una protección muy leve contra la progresión de la enfermedad, mientras que el Ab sustituto de CD19 (5 mg/kg SC, dos veces por semana) retrasó y redujo la incidencia de diabetes (Figura 14). Estos resultados sugieren que el Ab sustituto de CD19 no depletante puede retrasar y reducir la incidencia de diabetes tipo 1 en ratones NOD más que el Ab sustituto de anti-CD20 depletante.

Eficacia del Ab sustituto de CD19 no depletante y el Ab sustituto de CD20 depletante de las células B en un modelo de EAE en ratón in vivo

La encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE) experimental en ratón se ha usado

ampliamente como modelo de enfermedades inflamatorias neurodegenerativas y desmielinizantes, como la esclerosis múltiple (MS).

En este estudio, el Ab sustituto anti-CD19 no depletante se evaluó junto con el Ab sustituto de CD20 depletante en el modelo de EAE desmielinizante remitente-recidivante (RR) inducida por la proteína proteolipídica (PLP) en un modo semiterapéutico de tratamiento de la enfermedad (es decir, el anticuerpo se introdujo después de la inducción de la enfermedad, pero antes de que los animales comenzaran a desarrollar una puntuación clínica detectable).

Para el estudio se usaron ratones SJL hembras de 9-10 semanas de edad (Jackson Labs), con un peso corporal medio de 18-21 g. Los ratones se inmunizaron con Hooke Kit™ PLP139-151/Emulsión CFA (número de catálogo EK-0120, Hooke Laboratories, Lawrence MA) y 75 ng de toxina pertussis (PTX). Los animales se aleatorizaron basados en el peso corporal en grupos de estudio con 15 ratones en cada grupo. El Ab sustituto de CD19 no depletante, el Ab sustituto de CD20 depletante o el control de isotipo IgG1 de ratón de 5 mg/kg se administraron por vía subcutánea dos veces por semana a partir del día 8. La puntuación EAE se recogió diariamente con una escala de 0-6 en incrementos de 0,5 unidades. Los ratones se sacrificaron el día 42. El tratamiento con el Ab sustituto de CD19 no depletante reduce significativamente la puntuación EAE en el día 35-41 en comparación con el control de isotipo; con una disminución de 51 % en la puntuación EAE en el último día (**Figura 15**). El tratamiento con el Ab sustituto de CD20 depletante no demostró una reducción significativa de la puntuación de la enfermedad sobre el control del isotipo en ninguno de los momentos evaluados (**Figura 15**). Estos resultados sugieren que el Ab sustituto de CD19 no depletante puede reducir la gravedad de la enfermedad más que el Ab sustituto de CD20 depletante según lo evaluado por la puntuación clínica en el modelo EAE de esclerosis múltiple en un modo de tratamiento semiterapéutico.

LISTADO DE SECUENCIAS

C323

SEQ ID NO: 1 C323 HCDR1 (North)

KASGGTFSSYAIS

SEQ ID NO: 2 C323 HCDR2 (North)

GIIPIFGTAN

SEQ ID NO: 3 C323 HCDR3 (North)

AREDFGYNYGMDV

SEQ ID NO: 4 C323 LCDR1 (North)

RASQGVNSYYLA

SEQ ID NO: 5 C323 LCDR2 (North)

YATSTRAT

SEQ ID NO: 6 C323 LCDR3 (North)

QHYGNSLFT

SEQ ID NO: 7 C323 HC IgG4-S228P

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGT
ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGYNYGMDVWGQG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

SEQ ID NO: 8 ADN de C323 HC IgG4-S228P

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCCTCGGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGG
GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATC
TTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGG
ACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCTACAATTACGGCATGGACGT
CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCTACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAA

GACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG
AGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAGTTTCTG
GGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCC
GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCGTCTCCTCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

SEQ ID NO: 9 Región variable (VH) de C323 HC

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGT
ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGYNYGMDVWGQG
TTVTVSS

SEQ ID NO: 10 ADN de C323 HC VH

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGG
GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATC
TTTGGTACAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGG
ACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCTACAATTACGGCATGGACGT
CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 11 C323 LC

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGVNSYYLAWYQQKPGQAPRLLMYATSTRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGNSLFTFGPGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 12 ADN de C323 LC

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGGGTGTTAACAGCTACTACTTAGCCTGGTA
CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATGTATGCTACATCCACCAG

GGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC
TCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACT
ATGGTAACTCACTATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGAC
CGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 13 Región variable (VL) de C323 LC

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGVNSYYLAWYQQKPGQAPRLLMYATSTRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGNSLFTFGPGTKVEIK

SEQ ID NO: 14 ADN de C323 LC VL

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGGGTGTAAACAGCTACTACTTAGCCTGGTA
CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATGTATGCTACATCCACCAG
GGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC
TCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACT
ATGGTAACTCACTATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

C323.C1

SEQ ID NO: 15 C323.C1 HCDR1 (North)

KASGGTISSYAYS

SEQ ID NO: 16 C323.C1 HCDR2 (North)

GIIPIFTAN

SEQ ID NO: 17 C323.C1 HCDR3 (North)

AREDFGYNAMDV

SEQ ID NO: 18 C323.C1 LCDR1 (North)

RASQKVNSYYLH

SEQ ID NO: 19 C323.C1 LCDR2 (North)

YATRTRPT

SEQ ID NO: 20 C323.C1 LCDR3 (North)

QHYGQSLFT

SEQ ID NO: 21 C323.C1 HC IgG4-S228P

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFT
ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGYNAMDVWGQG

TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGL

SEQ ID NO:22 ADN de C323.C1 HC IgG4-S228P

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCATAGCAGCTATGCTTACAGCTGG
GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATC
TTTGACACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGG
ACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCTACAATTACGCGATGGACGT
CTGGGGCCAAGGGACCCTTGTACCGTCTCCTCAGCTTCTACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGG
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAA
GACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG
AGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTTCTG
GGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCC
GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGCTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

SEQ ID NO: 23 C323.C1 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGGIPIFD
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGYNVAMDVWGQ

TLVTVSS

SEQ ID NO: 24 ADN de C323.C1 VH

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCATAGCAGCTATGCTTACAGCTGG
GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATC
TTTGACACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGG
ACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCTACAATTACGCGATGGACGT
CTGGGGCCAAGGGACCCTTGTACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 25 C323.C1 LC

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQKVNSYYLHWYQQKPGQAPRLLIYATRTRPTG
IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 26 ADN de C323.C1 LC

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAAAGTTAACAGCTACTACTTACATTGGTA
CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTACAAGAACCAG
GCCAACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC
TCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACT
ATGGTCAGTCACTATTCACTTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGAC
CGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 27 C323.C1 VL

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQKVNSYYLHWYQQKPGQAPRLLIYATRTRPTG
IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSLFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 28 ADN de C323.C1 VL

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAAAGTTAACAGCTACTACTTACATTGGTA
CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTACAAGAACCAG
GCCAACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC

TCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACT
ATGGTCAGTCACTATTCACTTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

CB3f

SEQ ID NO: 29 CB3f/CB3 HCDR1 (North)

KASGHTISSYAYS

SEQ ID NO: 30 CB3f/CB3 HCDR2 (North)

DIIPAYGSPN

SEQ ID NO: 31 CB3f/CB3 HCDR3 (North)

AREDFGKNYAMDV

SEQ ID NO: 32 CB3f LCDR1 (North)

RASQHVSSHILA

SEQ ID NO: 33 CB3f LCDR2 (North)

YGASSRAT

SEQ ID NO: 34 CB3f LCDR3 (North)

QHYGQSQFT

SEQ ID NO: 35 CB3f/CB3 HC IgG4-S228P

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGHTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGDIIPAYG
SPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDFGKNYAMDVWGQ
GTLTVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

SEQ ID NO: 36 ADN de CB3f/CB3 HC IgG4-S228P

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGACATACCATAGCAGCTATGCTTACAGCTGG
GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGACATCATCCCTGCC
TATGGCTCACCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGG
ACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCAAGAATTACGCGATGGACG
TCTGGGGCCAAGGGACCCTTGTACCGTCTCCTCAGCTTCTACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAATC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG

ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAA
GACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG
AGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTTCTG
GGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCC
GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCGTCTCCTCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

SEQ ID NO: 37 CB3f/CB3 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVVSCKASGHTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGDIIPAYG
SPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDFGKNYAMDVWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 38 ADN de CB3f/CB3 VH

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGACATACCATTAGCAGCTATGCTTACAGCTGG
GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGACATCATCCCTGCC
TATGGCTCACCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACGCGG
ACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCAAGAATTACGCGATGGACG
TCTGGGGCCAAGGGACCCTTGTACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 39 CB3f LC

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQHVSSHILAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSQFTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 40 ADN de CB3f LC

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGCATGTTAGCAGCCACTACTTAGCTTGGTA

CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG
GGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC
TCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACT
ATGGTCAGTCACAGTTCACTTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGA
CCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 41 CB3f VL

EIVLTQSPGTLNLSLSPGERATLSCRASQHVSSHVLAHWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSQFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 42 ADN de CB3f VL

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGCATGTTAGCAGCCACTACTTAGCTTGGTA
CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG
GGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC
TCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACT
ATGGTCAGTCACAGTTCACTTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

CB3 (solo LC; HC idéntica a CB3f)

SEQ ID NO: 43 CB3 LCDR1 (North)

RASQHVNSHYLA

SEQ ID NO: 44 CB3 LCDR2 (North)

YATRTRPT

SEQ ID NO: 45 CB3 LCDR3 (North)

QHYGQSQFT

SEQ ID NO: 46 CB3 LC

EIVLTQSPGTLNLSLSPGERATLSCRASQHVNSHYLAHWYQQKPGQAPRLLIYATRTRPTG
IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSQFTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 47 ADN de CB3 LC

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGCATGTAAACAGCCACTACTTAGCTTGGTA

CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTACAAGAACCAG
GCCAACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC
TCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACT
ATGGTCAGTCACAGTTCACTTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGA
CCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 48 CB3 VL

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQHVNSHYLAWYQQKPGQAPRLLIYATRTRPTG
IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSQTFTGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 49 ADN de CB3 VL

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGCATGTAAACAGCCACTACTTAGCTTGGA
CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTACAAGAACCAG
GCCAACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC
TCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACT
ATGGTCAGTCACAGTTCACTTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

CB3f/CB3-IgG1

SEQ ID NO: 50 CB3f/CB3 IgG1 HC

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGHTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGDIIPAYG
SPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDFGKNYAMDVWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 51 ADN de CB3f/CB3 IgG1 HC

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGACATACCATTAGCAGCTATGCTTACAGCTGG
GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGACATCATCCCTGCC
TATGGCTCACCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGG

ACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA
 CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCAAGAATTACGCGATGGACG
 TCTGGGGCCAAGGGACCCTTGTACCGTCTCCTCAGCTTCTACCAAGGGCCCATC
 GGTCTTCCCGCTAGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT
 GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTC
 AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG
 ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
 GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
 GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCACGACCTG
 AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCT
 CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
 CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
 CCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
 CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGACGAGCTGACC
 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCC
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACA
 AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
 TGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

CB3f/CB3-nulo efector de IgG1

**SEQ ID NO: 52 CB3f/CB3 nulo efector de IgG1 HC (LC idéntica a CB3f/CB3)
 (cambios respecto a IgG1 WT subrayados)**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGHTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGDIIPAYG
 SPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGKNYAMDVWGQ
 GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 53 ADN de CB3f/CB3 nulo efector de IgG1 HC (LC idéntica a
 CB3f/CB3)**

CAGGTGCAACTTGTCCAAAGCGGAGCTGAGGTAAAGAAACCAGGTTCATCTGTGA

AGGTGTCATGTAAGGCAAGCGGCCACACCATTTTCATCTTACGCATACTCCTGGGT
TCGACAAGCTCCAGGCCAGGGATTGGAATGGATGGGAGACATAATCCCAGCATA
CGGATCACCTAACTACGCACAGAAGTTTCAGGGGAGAGTGACAATTACAGCCGAC
GAGTCTACTAGCACTGCTTACATGGAGTTGTCTTCACTTCGGTCAGAGGATACAG
CAGTTTACTATTGTGCCAGGGAGGATTTCCGGGAAAAATTATGCTATGGATGTATGG
GGTCAGGGCACCCTGGTTACTGTATCATCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA
GCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCC
GCCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGTCCGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG
AACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCG
TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATTCCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA

C323.C1-nulo efector de IgG1

SEQ ID NO: 54 C323.C1 nulo efector IgG1 HC (LC idéntica a CB3.C1) (cambios respecto a IgG1 WT subrayados)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTISYAYSWVRQAPGQGLEWMGGIIPFDT
ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGYNAMDVWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTT
CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVVSVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 55 ADN de C323.C1 nulo efector de IgG1 HC

CAGGTTTCAGCTCGTGCAAAGTGGAGCTGAGGTGAAAAACCTGGTTCTAGCGTCA
AGGTCTCTTGTAAGGCCTCTGGGGGCACTATAAGCTCTTATGCTTATAGTTGGGT
GCGCCAGGCCCCAGGACAGGGCTTGAATGGATGGGCGGCATAATACCCATATT
CGACACAGCCAACTACGCTCAAAAATTTTCAGGGGAGAGTGACTATAACTGCAGAC
GAGAGCACTAGCACCGCTTACATGGAGTTGAGTAGTCTCCGCAGTGAAGACACAG
CCGTCTATTATTGCGCTAGGGAGGACTTTGGTTACAACCTACGCCATGGATGTCTG
GGGCCAGGGTACTTTGGTCACCGTATCTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGT
CTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT
CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAG
CCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCA
TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGTCCGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
CACCGTCCTGCACCAAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAA
GAACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATTCCAAGCTACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA

**SEQ ID NO: 56 Isoforma 1 de CD19 humano (Secuencia de referencia NCBI:
NP_001171569.1)**

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESP
LKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVN
VEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEG
EPPCLPPRDSLNSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSL
LSLELKDDRPARDMWVDMETGLLLPRATAQDAGKYCHRGNTMSFHLEITARPVLWH
WLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRRFFKVTPPP
GSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRS

PPGVGPEEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSYENPEDEPLGPE
DEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSWDPSREATSLAGSQSYEDMRG
ILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGGRMGWSTR

**SEQ ID NO: 57 Isoforma 2 de CD19 humano (Secuencia de referencia NCBI:
NP_001761.3)**

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESP
LKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVN
VEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEG
EPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSL
LSLELKDDRPARDMWV METGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWH
WLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPP
GSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSR
PPGVGPEEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSYENPEDEPLGPE
DEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSWDPSREATSLG SQSYEDMRGI
LYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGGRMGWSTR