

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 146**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2012 PCT/US2012/056429**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13043933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2012 E 12766835 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 2758437**

54 Título: **Proteínas de unión al antígeno CD27L**

30 Prioridad:

22.09.2011 US 201161538024 P

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

16.02.2021

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**DELANEY, JOHN M.;
FANSLOW, WILLIAM CHRISTIAN, III y
KING, CHADWICK TERENCE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 806 146 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión al antígeno CD27L

Campo de la invención

5 El campo de la presente invención se refiere a composiciones de proteínas de unión a antígenos que incluyen anticuerpos capaces de unirse a CD27L, así como también a métodos relacionados.

Antecedentes

10 CD27L (CD70, TNFSF7) es una proteína de membrana integral de tipo II cuya expresión en tejidos normales se restringe altamente a un subconjunto de células T y B activadas, células dendríticas, y a un pequeño subconjunto de células en el epitelio tímico. Las funciones biológicas de CD27L, que incluyen el aumento o la regulación de la respuesta inmune, son mediadas por la unión a su receptor, CD27, que se expresa en forma predominante en células linfoides. Las interacciones CD27L/CD27 regulan la proliferación y diferenciación de células B y la co-estimulación/activación de células T. La disrupción de la interacción CD27L/CD27 en ratones deficientes de CD27 no produce ningún fenotipo en ausencia de una prueba inmune. (Grewal, Expert Opin. Ther. Targets. 12, 341-351 (2008)).

15 Además de su expresión muy restringida en tejidos normales, CD27L se expresa en niveles relativamente altos en algunos subtipos de tumores linfoma no Hodgkin de células B (B-NHL), en pre-leucemia linfocítica aguda de células B (ALL) y en leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL). La expresión aberrante de CD27L también se observa en carcinoma de células renales (RCC) pero no en tejidos renales normales ni otros tejidos normales. Por lo tanto, CD27L parece exhibir propiedades coherentes con aquellas de un "antígeno específico de tumores" (Grewal, Expert Opin. Ther. Targets. 12,341-351 (2008)).

20 El documento WO 2008/074004A2 describe anticuerpos humanos que se unen a CD70 y sus usos.

El documento WO 2006/113909A2 describe agentes de unión anti-CD70 humanizados y sus usos.

El documento WO 2009/126934A2 describe la detección y el tratamiento de cáncer de páncreas, ovario y otros tipos.

El documento WO 2006/044643A2 describe un anticuerpo anti-CD70 y su uso para el tratamiento y la prevención de cáncer y trastornos inmunes.

25 Cada año, de aproximadamente 49.000 pacientes que padecen RCC, poco más de 40.000 son diagnosticados con ccRCC en EE. UU. (Informe de American Cancer Society: Cancer Facts and Figures (2008). Si bien algunos fármacos terapéuticos más nuevos han sido aprobados para el RCC en los últimos 4 años, la tasa de supervivencia de 5 años para pacientes con RCC metastásico sigue siendo sombría de 10-20% (National Cancer Institute. SEER cancer statistics fact sheet: cancer of the kidney and renal pelvis – acceso de 2008) y aún existen necesidades médicas importantes no satisfechas. El número proyectado anualmente de pacientes con un diagnóstico nuevo de ccRCC (EE. UU.) que se espera expresen CD27L es aproximadamente 36.000. Se estima que existen 64.000 pacientes de ccRCC con la enfermedad activa.

30 De las malignidades de las células B que se describe que expresan CD27L en forma aberrante, los subconjuntos B-NHL de linfoma de células B grandes, difusas (DLBCL) y linfoma folicular (FL) exhiben la incidencia más alta de expresión que oscila entre 33% para FL y 71% para DLBCL según lo evaluado por IHC en cortes congelados usando un anticuerpo validado (Lens et al., Brit. J. Hematol. 106,491-503 (1999). Entre 50 y 89 % de los tumores de B-CLL también expresan CD27L según lo evaluado por IHC en cortes de tumores congelados o por citometría de flujo en células tumorales circulantes (Ranheim et al., Blood 85, 3556-3565 (1965); Trentin et al., Cancer Res. 57, 4940-4947 (1997)).

40 De los 127.000 pacientes en EE. UU. que actualmente presentan B-NHL activo, aproximadamente 50% de estos pacientes presentan el subtipo DLBCL (grado intermedio) (Morton et al., Blood 107,265-276 (2002)). A pesar de la terapia de cuidado estándar (CHOP) con Rituxan más ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona para pacientes con DLBCL, prácticamente el 50% experimentan una recidiva. Por lo tanto, existe una necesidad médica no satisfecha también en esta enfermedad.

45 Sumario

El objeto de la invención se señala en las reivindicaciones.

En particular, en un aspecto, la invención da a conocer una proteína de unión al antígeno CD27L que comprende un dominio variable de las cadenas ligeras y un dominio variable de las cadenas pesadas, en donde

50 a) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende una LCDR1 según lo expuesto en la SEQ ID NO: 74; una LCDR2 según lo expuesto en la SEQ ID NO: 82; y una LCDR3 según lo expuesto en la SEQ ID NO: 90; y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende una HCDR1 según lo expuesto en la SEQ ID NO: 28; una HCDR2 según lo expuesto en la SEQ ID NO: 36; y una HCDR3 según lo expuesto en la SEQ ID NO: 44;

b) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero tiene una mutación R24K-S26G, y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 pero tiene una mutación N31S-I34M;

5 c) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero tiene una mutación R24K-S26G, y el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;

d) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero tiene una mutación L55I-Y58F, y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;

10 e) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero tiene una mutación Q95N-T96S, y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 pero tiene una mutación N31S-I34M; o

15 f) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero tiene una mutación Q95N-T96S, y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20.

En una realización preferida, la invención da a conocer una proteína de unión al antígeno CD27L anteriormente mencionada, en donde la proteína de unión al antígeno CD27L se conjuga a un agente quimioterapéutico, preferiblemente mediante un enlazador, en donde el enlazador es preferiblemente un enlazador no escindible, que preferiblemente comprende MCC. El agente quimioterapéutico preferiblemente se conjuga a una o más lisinas contenidas con un polipéptido de la proteína de unión al antígeno CD27L. Además, el agente quimioterapéutico es preferiblemente DM1. En otro aspecto, la invención da a conocer una composición que comprende conjugados de la proteína de unión al antígeno CD27L anterior-DM1, en donde el número promedio de moléculas de DM1 por proteína de unión al antígeno CD27L oscila entre 1 y 10, preferiblemente entre 3 y 7, preferiblemente entre 4 y 6, o 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0.

25 En otro aspecto, la invención da a conocer un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido, en donde dicho polipéptido comprende:

30 a) un dominio variable de las cadenas ligeras que comprende una LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; una LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 82; y una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 90; y un dominio variable de las cadenas pesadas que comprende un HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 28; un HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 36; y un HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 44;

35 b) un dominio variable de cadenas ligeras que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero que tiene una mutación R24K-S26G o una mutación Q95N-T96S; y un dominio variable de las cadenas pesadas que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 pero que tiene una mutación N31S-I34M; o

c) un dominio variable de las cadenas ligeras que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero que tiene una mutación L55I-Y58F; y un dominio variable de las cadenas pesadas que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20.

40 En otro aspecto, la invención da a conocer un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado anteriormente mencionado.

En otro aspecto, la invención da a conocer una célula hospedante recombinante que comprende el ácido nucleico aislado anterior operativamente enlazado a un promotor, o que comprende el vector de expresión anterior.

En otro aspecto, la invención da a conocer un método para elaborar un conjugado de fármaco-anticuerpo CD27L, en donde dicho método comprende las etapas de:

- 45 (i) a) proporcionar la proteína de unión al antígeno CD27L anteriormente mencionada
 b) conjugar la proteína de unión al antígeno CD27L a un enlazador; y
 c) conjugar un fármaco a dicho enlazador;

en donde el enlazador preferiblemente comprende MCC; el fármaco preferiblemente comprende DM1; o el enlazador preferiblemente comprende MCC y el fármaco preferiblemente comprende DM1; o

- 50 (ii) a) proporcionar la proteína de unión al antígeno CD27L anteriormente mencionada; y
 b) conjugar un enlazador covalentemente unido a un fármaco, a dicha proteína de unión al antígeno CD27L.

En otro aspecto, la invención da a conocer la proteína de unión al antígeno CD27L anteriormente mencionada conjugada a DM1 a través de un enlazador MCC, para uso en un método para tratar cáncer, en donde dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha proteína de unión al antígeno CD27L a un paciente que lo necesita.

- 5 El objeto que se expone a continuación, que se extiende más allá del objeto de las reivindicaciones, se describe no obstante como parte de la presente solicitud.

La invención da a conocer proteínas de unión al antígeno CD27L, p. ej., anticuerpos y sus fragmentos funcionales. Las proteínas de unión al antígeno anti-CD27L son particularmente útiles en métodos para tratar enfermedades y trastornos asociados con la proliferación celular aberrante, p. ej., cáncer, y/o con inflamación.

- 10 En un primer aspecto, la proteína de unión al antígeno CD27L comprende a) un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90% identidad, por lo menos 95% identidad o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 o SEQ ID NO:70; b) un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90% identidad, por lo menos 95% identidad, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 o SEQ ID NO:24; o c) el dominio variable de las cadenas ligeras de a) y el dominio variable de las cadenas ligeras de b).

- Las proteínas de unión antígenos preferidas del primer aspecto incluyen aquellas que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:63 y un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:17; aquellas que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:64 y un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:18; aquellas que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:65 y un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:19; aquellas que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:66 y un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:20; aquellas que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:67 y un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:21; aquellas que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:68 y un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:22; aquellos que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:69 y un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:23; y aquellas que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:70 y un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:24.

- En un segundo aspecto, la proteína de unión al antígeno CD27L comprende a) un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 o SEQ ID NO:70; b) un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 o SEQ ID NO:24; o c) el dominio variable de las cadenas ligeras de a) y el dominio variable de las cadenas pesadas de b).

- Las proteínas de unión a antígenos preferidas del segundo aspecto incluyen aquellas que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:63 y un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17; aquellas que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:64 y un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:18; aquellas que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:65 y un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene no más de diez o

que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:28; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:36; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:44; m) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:29; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:37; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 en SEQ ID NO:45; n) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:30; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:38; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:46; o) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:31; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:39; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:47; o p) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:32; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:40; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:48.

Las proteínas de unión al antígeno CD27L preferidas del tercer aspecto incluyen aquellas que comprenden el dominio variable de las cadenas ligeras de a) y el dominio variable de las cadenas ligeras de i); aquellas que comprenden el dominio variable de las cadenas ligeras de b) y el dominio variable de las cadenas pesadas de j); aquellas que comprenden el dominio variable de las cadenas ligeras de c) y el dominio variable de las cadenas pesadas de k); aquellas que comprenden el dominio variable de las cadenas ligeras de d) y el dominio variable de las cadenas pesadas de l); aquellas que comprenden el dominio variable de las cadenas ligeras de e) y el dominio variable de las cadenas pesadas de m); aquellas que comprenden el dominio variable de las cadenas pesadas de f) y el dominio variable de las cadenas pesadas de n); aquellas que comprenden el dominio variable de las cadenas ligeras de g) y el dominio variable de las cadenas pesadas de o); y aquellas que comprenden el dominio variable de las cadenas ligeras de h) y el dominio variable de las cadenas pesadas de p).

En un cuarto aspecto de la invención, la proteína de unión al antígeno CD27L del primero, segundo o tercer aspecto se une a CD27L humano con una afinidad inferior o igual a 2×10^{-11} M.

En un quinto aspecto de la invención, la proteína de unión al antígeno CD27L del primero, segundo, tercero o cuarto aspecto inhibe la unión de CD27L a CD27.

En un sexto aspecto de la invención, la proteína de unión al antígeno CD27L del primero, segundo, tercero, cuarto o quinto aspecto es un anticuerpo, tal como un anticuerpo humano. Los anticuerpos preferidos incluyen aquellos anticuerpos que comprenden una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID:56 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10; aquellos que comprenden una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID:57 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11; aquellos que comprenden una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID:58 y una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO:12; aquellos que comprenden una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID:59 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:13; aquellos que comprenden una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID:60 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:14; aquellos que comprenden una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID:61 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:15; y aquellos que comprenden una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID:62 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:16.

En un séptimo aspecto, una proteína de unión al antígeno CD27L del primero, segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto aspecto se conjuga a un fármaco o agente quimioterapéutico. En realizaciones preferidas, el fármaco o el agente quimioterapéutico se conjuga a la proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, usando un enlazador. Los enlazadores preferidos incluyen enlazadores no escindibles tales como MCC. Un quimioterapéutico preferido es DM1. Por lo tanto, en realizaciones particularmente preferidas, el séptimo aspecto da a conocer una proteína de unión al antígeno CD27L del primero, segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto aspecto conjugada a DM1 por un enlazador de MCC sujetado a uno o más residuos lisina.

El proceso de conjugar DM1 a una proteína de unión al antígeno CD27L, p. ej., anticuerpo, producirá una composición que comprende una población de anticuerpos conjugados a DM1 que tiene una gama de moléculas DM1 por anticuerpo. Es posible medir un número promedio para la composición. En realizaciones preferidas, el número promedio de moléculas DM1 por proteína de unión al antígeno CD27L, p. ej., anticuerpo, oscila entre 1 y 10, entre 3 y 7, o entre 4 y 6. En realizaciones preferidas, la composición de proteínas de unión al antígeno CD27L del primero,

segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto o séptimo aspecto de la presente invención tiene un número promedio de moléculas DM1 por proteína de unión al antígeno CD27L de aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9 o aproximadamente 6,0. Dicha composición puede contener una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión al antígeno CD27L y se puede liofilizar.

En un octavo aspecto, la invención da a conocer ácidos nucleicos aislados que codifican uno o más componentes de polipéptidos de una proteína de unión al antígeno CD27L, p. ej., una cadena ligera de anticuerpos o una cadena pesada de anticuerpos. En realizaciones y descripciones preferidas, el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende:

a) un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 95% identidad a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:63; SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 o SEQ ID NO:70;

b) un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene por lo menos 95% identidad a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 o SEQ ID NO:24;

c) un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 o SEQ ID NO:70;

d) un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 o SEQ ID NO:24;

e) un dominio variable de las cadenas pesadas que comprende:

i) una LCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR1 expuesta en SEQ ID NO:71; una LCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR2 expuesta en SEQ ID NO:79; y una LCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR3 expuesta en SEQ ID NO:87;

ii) una LCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR1 expuesta en SEQ ID NO:72; una LCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR2 expuesta en SEQ ID NO:80; y una LCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR3 expuesta en SEQ ID NO:88;

iii) una LCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR1 expuesta en SEQ ID NO:73; una LCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR2 expuesta en SEQ ID NO:81; y una LCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR3 expuesta en SEQ ID NO:89;

iv) una LCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR1 expuesta en SEQ ID NO:74; una LCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR2 expuesta en SEQ ID NO:82; y una LCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR3 expuesta en SEQ ID NO:90;

v) una LCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR1 expuesta en SEQ ID NO:75; una LCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR2 expuesta en SEQ ID NO:83; y una LCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR3 expuesta en SEQ ID NO:91;

vi) una LCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR1 expuesta en SEQ ID NO:76; una LCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR2 expuesta en SEQ ID NO:84; y una LCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR3 expuesta en SEQ ID NO:92;

vii) una LCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR1 expuesta en SEQ ID NO:77; una LCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR2 expuesta en SEQ ID NO:85; y una LCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR3 expuesta en SEQ ID NO:93; o

viii) una LCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR1 expuesta en SEQ ID NO:78; una LCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de

aminoácidos de la secuencia de LCDR2 expuesta en SEQ ID NO:86; y una LCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de LCDR3 expuesta en SEQ ID NO:94; o

f) un dominio variable de las cadenas pesadas que comprende:

5 i) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:25; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:33; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:41;

10 ii) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:26; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:34; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:42;

15 iii) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:27; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:35; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:43;

iv) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:28; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:36; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:44;

20 v) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:29; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:37; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:45;

25 vi) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:30; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:38; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:46;

30 vii) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:31; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:39; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:47; o

35 viii) una HCDR1 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO:32; una HCDR2 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR2 expuesta en SEQ ID NO:40; y una HCDR3 que tiene no más de tres adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de HCDR3 expuesta en SEQ ID NO:48.

40 En determinadas realizaciones del octavo aspecto, el polipéptido codifica una cadena ligera del anticuerpo y es por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o es 100% idéntico a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 o SEQ ID NO:55. En otras realizaciones del octavo aspecto, el polipéptido codifica una cadena pesada del anticuerpo y es por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o 100% idéntico a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:9.

En un noveno aspecto, la invención da a conocer un vector de expresión que comprende uno o más ácidos nucleicos aislados del octavo aspecto. En ciertas realizaciones, el vector de expresión codifica una cadena ligera del anticuerpo, una cadena pesada del anticuerpo, o tanto una cadena ligera como una cadena pesada del anticuerpo.

45 En un décimo aspecto, la invención da a conocer una célula hospedante recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos aislados del octavo aspecto operativamente enlazada a un promotor, incluidas células hospedantes recombinantes que comprenden uno o más vectores de expresión del noveno aspecto de la invención. En realizaciones preferidas, la célula hospedante recombinante segrega un anticuerpo que se une a CD27L. Las células hospedantes preferidas son células hospedantes mamíferas, incluidas líneas celulares de CHO.

50 En un onceavo aspecto, la invención da a conocer métodos para elaborar un conjugado de fármaco- anticuerpo CD27L del séptimo aspecto conjugando un enlazador y un fármaco, p. ej., agente quimioterapéutico, a cualquiera de las proteínas de unión al antígeno CD27L del primero, segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto aspectos. El enlazador y el fármaco se pueden conectar primero y luego conjugarse a la proteína de unión al antígeno CD27L, o el enlazador puede primero conjugarse a la proteína de unión al antígeno CD27L y luego conectarse al fármaco. En realizaciones preferidas, el enlazador es MCC y el fármaco es DM1. En realizaciones particularmente preferidas, la proteína de

unión al antígeno CD27L es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:66 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:20 (p. ej., Ab4) conjugada a DM1 por MCC mediante reacción química de uno o más residuos lisina dentro del anticuerpo con MCC o MCC-DM1.

5 En algunas descripciones, la proteína de unión al antígeno CD27L es un anticuerpo de unión al antígeno que es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:63 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:17 (p. ej., Ab1), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:64 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:18 (p. ej., Ab2), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:65 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:19 (p. ej., Ab3), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:67 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:21 (p. ej., Ab5), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:68 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:22 (p. ej., Ab6), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:69 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:23 (p. ej., Ab7), o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:70 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:24 (p. ej., Ab8) conjugada a DM1 por MCC mediante reacción química de uno o más residuos lisina dentro del anticuerpo con MCC o MCC-DM1.

En un doceavo aspecto, la invención da a conocer una proteína de unión al antígeno CD27L de los aspectos anteriores para uso en un método para tratar cáncer, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión al antígeno CD27L del primero, segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto aspecto. En realizaciones preferidas, la proteína de unión al antígeno CD27L es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:66 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:20 (p. ej., Ab4).

30 En algunas descripciones, la proteína de unión al antígeno CD27L es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:63 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:17 (p. ej., Ab1), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:64 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:18 (p. ej., Ab2), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:65 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:19 (p. ej., Ab3), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:67 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:21 (p. ej., Ab5), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:68 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:22 (p. ej., Ab6), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:69 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:23 (p. ej., Ab7), o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:70 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:24 (p. ej., Ab8). En realizaciones particularmente preferidas, la proteína de unión al antígeno CD27L se conjuga a un agente quimioterapéutico (p. ej., DM1) por un enlazador (MCC). En otras realizaciones preferidas del doceavo aspecto, el anticuerpo comprende función efectora mejorada.

50 En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno CD27L se administra a un paciente que tiene carcinomas de células renales (RCC), RCC de células claras, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, cáncer de mama, tumor cerebral, carcinoma nasofaríngeo, linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de Burkitt, linfomas de células grandes anaplásicas (ALCL), mieloma múltiple, linfomas de células T cutáneas, linfomas de células escindidas pequeñas nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas de células T periféricas, linfomas de Lennert, linfoma inmunoblástico, leucemia/linfomas de células T (ATLL), leucemia de células T adultas (T-ALL), linfoma folicular enteroblástico/centrocítico (cb/cc) cáncer por linfoma folicular, linfoma de células grandes difusas de linaje B, linfoma de células T de tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfoma basado en la cavidad corporal asociado con VIH, carcinoma embrionario, carcinoma no diferenciado de rino-faringe, enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom u otro linfoma de células B.

60 En ciertas realizaciones, una muestra de un paciente se ensaya para expresión de CD27L antes de administrar la proteína de unión al antígeno CD27L. La expresión de CD27L se puede determinar ensayando la presencia de ARN

que codifica CD27L o la presencia de proteína CD27L en la muestra. La muestra puede ser una muestra de sangre o una biopsia.

Una descripción da a conocer métodos para tratar un trastorno autoinmune o inflamatorio, en donde dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión al antígeno CD27L de uno cualquiera del primero, segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto aspectos a un paciente que lo necesita. En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno CD27L es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:63 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:17 (p. ej., Ab1), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:64 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:18 (p. ej., Ab2), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:65 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:19 (p. ej., Ab3), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:66 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:20 (p. ej., Ab4), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:67 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:21 (p. ej., Ab5), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:68 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:22 (p. ej., Ab6), un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:69 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:23 (p. ej., Ab7), o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:70 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:24 (p. ej., Ab8). En realizaciones preferidas, la proteína de unión al antígeno CD27L inhibe la unión de CD27 a CD27L. En algunas realizaciones, el trastorno autoinmune o inflamatorio es lupus eritematoso sistémico (SLE), diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), esclerosis múltiple (MS), psoriasis, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoidea (RA) o glomerulonefritis. En otras realizaciones, el tratamiento inhibe o previene el rechazo de trasplante o la enfermedad injerto contra hospedante en el paciente.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Resumen de características funcionales y físicas de realizaciones ilustrativas de proteínas de unión al antígeno CD27L.

FIG. 2. Medición del nivel y tasa de internalización de Ab4 (A4) y Ab8 (A8) y sus contrapartidas conjugadas a células 786-0 con el transcurso del tiempo (A).

FIG. 3. Se cultivaron células 786-0 durante 4 días en presencia de concentraciones en aumento de anti estreptavidina-MCC-DM1, Ab4-MCC-DM1 y Ab8-MCC-DM1. Se midió el efecto del desarrollo celular usando el reactivo CELL-TITER-GLO que mide la cantidad de células usando una lectura luminiscente.

FIG. 4. Respuesta a la dosis de Ab4-MCC-DM1 y Ab8-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto 786-0. La dosis intravenosa en el día 24 se indica con la flecha en las dosis indicadas.

FIG. 5. Respuesta a la dosis de Ab4-MCC-DM1 y Ab8-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto Caki-1. El esquema de administración intravenosa se indica con las flechas.

FIG. 6. Respuesta a la dosis de Ab4-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto Raji. El esquema de administración intravenosa se indica con las flechas.

FIG. 7. Respuesta a la dosis variable de Ab4-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto 786-0.

FIG. 8. Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) Ab4-MCC-DM1 contra células de tumores Raji.

FIG. 9. Ensayo de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) Ab4-MCC-DM1 contra células de tumores Raji y 786-0.

FIG. 10. Comparación de expresión de CD27L para muestras de tumores primarios congelados que se califican "positivas" por IHC enmascarado. Los resultados indican que la expresión total de la proteína CD27L es la más alta en muestras de pacientes ccRCC, seguida de muestras de DLBCL (linfoma de células B grandes difusas); B-CLL y FL.

FIG. 11. Resultados de del análisis de ARNm de CD27L y expresión de proteína. Los resultados indican que existe una gran prevalencia de expresión de CD27L en células RCC, B-NHL y CLL.

FIG. 12. Expone la estructura de Ab-MCC-DM1 ADC descritos en el Ejemplo 2 de este documento.

Descripción detalla de las realizaciones preferidas

El objeto de la invención se expone en las reivindicaciones. El objeto señalado a continuación, que se extiende más allá del objeto de las reivindicaciones, se describe no obstante como parte de la presente solicitud.

5 Los encabezamientos de las secciones de este documento tienen propósitos organizativos y no deben interpretarse como limitativos del objeto descrito.

Se pueden utilizar técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo y transformación de tejido, purificación de proteínas, etc. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se pueden efectuar de conformidad con las especificaciones del fabricante o como se suelen poner en práctica en la técnica o como se describe en este documento. Los siguientes procedimientos y técnicas se pueden llevar a cabo en general de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y específicas que se citan y analizan a lo largo de la memoria. Véase, p. ej., Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. A menos que se den a conocer definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de química analítica, química orgánica y química medicinal y farmacéutica descritos en este documento son aquellos conocidos y utilizados comúnmente en la técnica. Se pueden utilizar técnicas convencionales para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación, y administración y tratamiento de pacientes.

CD27L

Las proteínas de unión a antígenos se unen a CD27L, que también se conoce como CD70 y TNFSF7. CD27L se describió por primera vez en la patente de EE. UU. núm. 5.573.924. Una secuencia de aminoácidos de CD27L humana ilustrativa se da a conocer en este documento como SEQ ID NO:1, que corresponde a la Secuencia de Referencia NCBI NP_001423.1 (GI:4507605). En determinadas realizaciones, la proteína de unión al antígeno bloquea la interacción de CD27L con su receptor CD27. Una secuencia de aminoácidos de CD27 ilustrativa se da a conocer como SEQ ID NO:2, que corresponde al Prot. suizo: P26842.2 (GI:269849546). Una secuencia de aminoácidos de CD27 madura corresponde a los aminoácidos 20-260 de SEQ ID NO:2.

25 Proteínas de unión al antígeno CD27L

La presente invención da a conocer proteínas de unión a antígenos que se unen específicamente a CD27L. Las realizaciones de las proteínas de unión a antígenos comprenden péptidos y/o polipéptidos que se unen específicamente a CD27L. Dichos péptidos o polipéptidos pueden opcionalmente incluir una o más modificaciones post-traducción. Las realizaciones de las proteínas de unión a antígenos y sus fragmentos, como se definen en este documento de diversas maneras, se unen específicamente a CD27L. Estas incluyen anticuerpos que se unen específicamente a CD27L humano, incluidos aquellos que inhiben la unión y/o activación de CD27L a CD27.

Las proteínas de unión al antígeno de la invención se unen específicamente a CD27L. "Se une específicamente", tal como se emplea en este documento, significa que la proteína de unión al antígeno preferiblemente se une a CD27L más que a otras proteínas. En algunas realizaciones, "se une específicamente" significa que la proteína de unión al antígeno CD27L tiene una afinidad mayor hacia CD27L que hacia otras proteínas. Las proteínas de unión al antígeno CD27L que se unen específicamente a CD27L pueden tener una afinidad de unión hacia CD27L humano inferior o igual a 1×10^{-7} M, inferior o igual a 2×10^{-7} M, inferior o igual a 3×10^{-7} M, inferior o igual a 4×10^{-7} M, inferior o igual a 5×10^{-7} M, inferior o igual a 6×10^{-7} M, inferior o igual a 7×10^{-7} M, inferior o igual a 8×10^{-7} M, inferior o igual a 9×10^{-7} M, inferior o igual a 1×10^{-8} M, inferior o igual a 2×10^{-8} M, inferior o igual a 3×10^{-8} M, inferior o igual a 4×10^{-8} M, inferior o igual a 5×10^{-8} M, inferior o igual a 6×10^{-8} M, inferior o igual a 7×10^{-8} M, inferior o igual a 8×10^{-8} M, inferior o igual a 9×10^{-8} M, inferior o igual a 1×10^{-9} M, inferior o igual a 2×10^{-9} M, inferior o igual a 3×10^{-9} M, inferior o igual a 4×10^{-9} M, inferior o igual a 5×10^{-9} M, inferior o igual a 6×10^{-9} M, inferior o igual a 7×10^{-9} M, inferior o igual a 8×10^{-9} M, inferior o igual a 9×10^{-9} M, inferior o igual a 1×10^{-10} M, inferior o igual a 2×10^{-10} M, inferior o igual a 3×10^{-10} M, inferior o igual a 4×10^{-10} M, inferior o igual a 5×10^{-10} M, inferior o igual a 6×10^{-10} M, inferior o igual a 7×10^{-10} M, inferior o igual a 8×10^{-10} M, inferior o igual a 9×10^{-10} M, inferior o igual a 1×10^{-11} M, inferior o igual a 2×10^{-11} M, inferior o igual a 3×10^{-11} M, inferior o igual a 4×10^{-11} M, inferior o igual a 5×10^{-11} M, inferior o igual a 6×10^{-11} M, inferior o igual a 7×10^{-11} M, inferior o igual a 8×10^{-11} M, inferior o igual a 9×10^{-11} M, inferior o igual a 1×10^{-12} M, inferior o igual a 2×10^{-12} M, inferior o igual a 3×10^{-12} M, inferior o igual a 4×10^{-12} M, inferior o igual a 5×10^{-12} M, inferior o igual a 6×10^{-12} M, inferior o igual a 7×10^{-12} M, inferior o igual a 8×10^{-12} M o inferior o igual a 9×10^{-12} M. Los métodos para medir la afinidad de unión de una proteína de unión al antígeno se conocen en la técnica. El Ejemplo 1 proporciona un método ilustrativo.

Se entiende que cuando se hace referencia a las distintas realizaciones de los anticuerpos de unión a CD27L en este documento, también se abarcan sus fragmentos de unión al antígeno CD27L. Un fragmento de unión a CD27L comprende cualquiera de los fragmentos de anticuerpos o dominios descritos en este documento que retiene la capacidad de unirse específicamente a CD27L. El fragmento de unión a CD27L puede estar en cualquiera de los andamios descritos en este documento.

En determinadas realizaciones terapéuticas, una proteína de unión al antígeno CD27L inhibe la unión de CD27L a CD27 y/o inhibe una o más actividades biológicas asociadas con la unión de CD27L a CD27, p. ej., señalización

- mediada por CD27. Se dice que dichas proteínas de unión a antígenos son "neutralizantes". En ciertas realizaciones, la proteína de unión al antígeno CD27L neutralizante se une específicamente a CD27L e inhibe la unión de CD27L a CD27 de cualquier parte entre 10% y 100%, tal como por lo menos aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o más. Por ejemplo, las proteínas de unión al antígeno CD27L se pueden ensayar para neutralizar la capacidad determinando la capacidad de la proteína de unión al antígeno para bloquear la unión de células CD27-Fc a MP-1 (Slack et al, Int. Immunol. (1995) 7(7): 1087-1092)).
- Las realizaciones de las proteínas de unión al antígeno comprenden una estructura de andamio, como se define de diversas maneras en este documento, con una o más regiones determinantes de complementaridad (CDR). Las realizaciones incluyen además proteínas de unión al antígeno que comprenden una estructura de andamio con uno o más dominios variables de anticuerpos, o bien pesados o ligeros. Las realizaciones incluyen anticuerpos que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras del Dominio Variable de las Cadenas Ligeras Ab4 (SEQ ID NO: 66) y/o un dominio variable de las cadenas pesadas del Dominio Variable de las Cadenas Pesadas Ab4 (SEQ ID NO: 20).
- Algunas realizaciones incluyen anticuerpos que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras seleccionado del grupo que consiste en el Dominio Variable de las Cadenas Ligeras Ab1 (LCv), Ab2 LCv, Ab3 LCv, Ab5 LCv, Ab6 LCv, Ab7 LCv y Ab8 LCv (SEQ ID NO:63-70, respectivamente) y/o un dominio variable de las cadenas pesadas seleccionado del grupo que consiste en el Dominio Variable de las Cadenas Pesadas Ab1 (HCv), Ab2 HCv, Ab3 HCv, Ab5 HCv, Ab6 HCv, Ab7 HCv y Ab8 HCv (SEQ ID NO:17-24, respectivamente), y sus fragmentos, derivados, muteínas y variantes.
- Una cadena ligera ilustrativa que comprende Ab1 LCv es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:56.
- Una cadena ligera ilustrativa que comprende Ab2 LCv es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:57.
- Una cadena ligera ilustrativa que comprende Ab4 LCv es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:58.
- Una cadena ligera ilustrativa que comprende Ab5 LCv es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:59.
- Una cadena ligera ilustrativa que comprende Ab6 LCv es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:60.
- Una cadena ligera ilustrativa que comprende Ab7 LCv es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:61.
- Una cadena ligera ilustrativa que comprende Ab8 LCv es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:62.
- Una cadena pesada ilustrativa que comprende Ab1 HCv es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10.
- Una cadena pesada ilustrativa que comprende Ab2 HCv es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11.
- Una cadena pesada ilustrativa que comprende Ab4 HCv es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12.
- Una cadena pesada ilustrativa que comprende Ab5 HCv es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:13.
- Una cadena pesada ilustrativa que comprende Ab6 HCv es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:14.
- Una cadena pesada ilustrativa que comprende Ab7 HCv es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:15.
- Una cadena pesada ilustrativa que comprende Ab8 HCv es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:16.
- Los ejemplos adicionales de andamios que se contemplan incluyen: fibronectina, neocarzinostatina CBM4-2, lipocalinas, receptor de células T, dominio de proteína A (proteína Z), Im9, proteínas TPR, dominios dedo de zinc, pVIII, polipéptido pancreático aviar, GCN4, dominio 3 Src de homología con el dominio WW, dominios PDZ, TEM-1

beta-lactamasa, tioredoxina, nucleasa estafilocócica, dominios dedo PHD, CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, ecotin, LACI-D1, LDTI, MTI-II, toxinas escorpión, defensina de insecto-péptido A, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, citocromo b-562, dominios del receptor Ldl, gama-cristalina, ubiquitina, transferrina y/o dominios de tipo C o de tipo lectina. Los andamios no de anticuerpo y su uso como terapéuticos se revisan en Gebauer and Skerra, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13:245-255 (2009) y Binz et al., *Nat. Biotech.*, 23(10):1257-1268 (2005).

Los aspectos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden los siguientes dominios variables: Ab4 LCv/Ab4 HCv (SEQ ID NO:66/SEQ ID NO:20) y combinaciones de estos.

Las realizaciones incluyen anticuerpos que comprenden los siguientes dominios variables: Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:63/SEQ ID NO:17), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:64/SEQ ID NO:18), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:65/SEQ ID NO:19), Ab5 LCv/Ab5 HCv (SEQ ID NO:67/SEQ ID NO:21), Ab6 LCv/Ab6 HCv (SEQ ID NO:68/SEQ ID NO:22), Ab7 LCv/Ab7 HCv (SEQ ID NO:69/SEQ ID NO:23), Ab8 LCv/Ab8 HCv (SEQ ID NO:70/SEQ ID NO:24), y combinaciones de estos, además de sus fragmentos, derivados, muteínas y variantes. Los anticuerpos ilustrativos de la invención incluyen Ab4 (SEQ ID NO:58/SEQ ID NO:12).

Los anticuerpos ilustrativos incluyen Ab1 (SEQ ID NO:56/SEQ ID NO:10), Ab2 (SEQ ID NO:57/SEQ ID NO:11), Ab5 (SEQ ID NO:59/SEQ ID NO:13), Ab6 (SEQ ID NO:60/SEQ ID NO:14), Ab7 (SEQ ID NO:61/SEQ ID NO:15), Ab8 (SEQ ID NO:62/SEQ ID NO:16).

Típicamente, cada dominio variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpos comprende tres CDR. El dominio variable de la cadena pesada comprende una CDR1 de cadena pesada (HCDR1), una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) y una CDR3 de cadena pesada (HCDR3). El dominio variable de la cadena ligera comprende una CDR1 de cadena ligera (LCDR1), una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) y una CDR3 de cadena ligera (LCDR3). En determinadas realizaciones, una proteína de unión al antígeno comprende una o más CDR contenidas dentro de los dominios variables preferidos descritos en este documento.

Los ejemplos de dichas CDR incluyen, aunque sin limitarse a ello:

las CDR de Ab1 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:71), LCDR2 (SEQ ID NO:79) y LCDR3 (SEQ ID NO:87);

las CDR de Ab2 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:72), LCDR2 (SEQ ID NO:80) y LCDR3 (SEQ ID NO:88);

las CDR de Ab3 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:73), LCDR2 (SEQ ID NO:81) y LCDR3 (SEQ ID NO:89);

las CDR de Ab4 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:74), LCDR2 (SEQ ID NO:82) y LCDR3 (SEQ ID NO:90);

las CDR de Ab5 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:75), LCDR2 (SEQ ID NO:83) y LCDR3 (SEQ ID NO:91);

las CDR de Ab6 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:76), LCDR2 (SEQ ID NO:84), y LCDR3 (SEQ ID NO:92);

las CDR de Ab7 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:77), LCDR2 (SEQ ID NO:85) y LCDR3 (SEQ ID NO:93);

las CDR de Ab8 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:78), LCDR2 (SEQ ID NO:86) y LCDR3 (SEQ ID NO:94);

las CDR de Ab1 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:25), HCDR2 (SEQ ID NO:33) y HCDR3 (SEQ ID NO:41);

las CDR de Ab2 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:26), HCDR2 (SEQ ID NO:34) y HCDR3 (SEQ ID NO:42);

las CDR de Ab3 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:27), HCDR2 (SEQ ID NO:35) y HCDR3 (SEQ ID NO:43);

las CDR de Ab4 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:28), HCDR2 (SEQ ID NO:36) y HCDR3 (SEQ ID NO:44);

las CDR de Ab5 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:29), HCDR2 (SEQ ID NO:37) y HCDR3 (SEQ ID NO:45);

las CDR de Ab6 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:30), HCDR2 (SEQ ID NO:38) y HCDR3 (SEQ ID NO:46);

las CDR de Ab7 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:31), HCDR2 (SEQ ID NO:39) y HCDR3 (SEQ ID NO:47); y

las CDR de Ab8 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:32), HCDR2 (SEQ ID NO:40) y HCDR3 (SEQ ID NO:48).

En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende: A) un polipéptido, p. ej., una cadena ligera, que comprende una LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74; una LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82; y una LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90; y B) un polipéptido, p. ej., una cadena pesada, que comprende una HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28; una HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y una HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.

En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende: A) un polipéptido, p. ej., una cadena ligera, que comprende una LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID

- NOS:71, 72, 73, 75, 76, 77 y 78; una LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 79, 80, 81, 83, 84, 85, and 86; y/o una LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:87, 88, 89, 91, 92, 93 y 94; y/o B) un polipéptido, p. ej., una cadena pesada, que comprende una HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:25, 26, 27, 29, 30, 31 y 32; una HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:33, 34, 35, 37, 38, 39 y 40; y/o una HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:41, 42, 43, 45, 46, 47 y 48.
- En otras realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende A) una secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras que comprende una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de Ab4 LCv, y B) una secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas que comprende una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de Ab4 HCv.
- En otras realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende A) una secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras que comprende una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de cualquiera de Ab1 LCv, Ab2 LCv, Ab3 LCv, Ab5 LCv, Ab6 LCv, Ab7 LCv y Ab8 LCv, y B) una secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas que comprende una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de cualquiera de Ab1 HCv, Ab2 HCv, Ab3 HCv, Ab5 HCv, Ab6 HCv, Ab7 HCv y Ab8 HCv.
- En ciertas realizaciones, las CDR incluyen no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de una CDR ilustrativa expuesta en este documento.
- Los aspectos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden un dominio variable de las cadenas ligeras seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y 70. Los aspectos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden un dominio variable de las cadenas pesadas seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24. Otros aspectos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden A) un dominio variable de las cadenas ligeras seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y 70, y B) un dominio variable de las cadenas pesadas seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24.
- Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier región constante conocida en la técnica. La región constante de las cadenas ligeras puede ser, por ejemplo, una región constante de las cadenas ligeras de tipo kappa o lambda, p. ej., una región constante de las cadenas ligeras de tipo kappa o lambda humana. La región constante de las cadenas pesadas puede ser, por ejemplo, una región constante de las cadenas pesadas de tipo alfa, delta, épsilon, gama o mu, p. ej., una región constante de las cadenas pesadas de tipo alfa, delta, épsilon, gama o mu humana. En una realización, la región constante de las cadenas pesadas o ligeras es un fragmento, derivado, variante o muteína de una región constante natural.
- Los aspectos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de las cadenas ligeras seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y 70 que tiene no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos. Los aspectos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de las cadenas pesadas seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 que tiene no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos. Otros aspectos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden A) una región variable de las cadenas ligeras seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y 70 que tiene no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos, y B) una región variable de las cadenas pesadas seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 que no tiene más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones ilustrativas, un anticuerpo comprende 1) una variante del dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:66, en donde la fenilalanina en la posición 51 se muta a una leucina y/o la prolina en la posición 105 se muta a una glicina o una glutamina; 2) una variante del dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NO:20, en donde la glutamina en la posición 1 se muta a ácido glutámico y/o la arginina en la posición 16 se muta a una glicina; o una variante del dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NO:66, en donde la fenilalanina en la posición 51 se muta a una leucina y/o la prolina en la posición 105 se muta a una glicina o glutamina y una variante del dominio variable de las cadenas ligeras expuesto en SEQ ID NO:20, en donde la glutamina en la posición 1 se muta a ácido glutámico y/o la arginina en la posición 16 se muta a una glicina.
- En una variación, la proteína de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntico a una secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y 70. En otra variación, la proteína de unión al antígeno comprende

una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%; por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24. Incluso en otra realización, la proteína de unión al antígeno comprende A) una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y 70, y B) una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende una CDR3 de las cadenas ligeras y/o de las cadenas pesadas. En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias expuestas en SEQ ID NOS: 90 y 44. En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias expuestas en SEQ ID NOS:87, 88, 89,91,92, 93,94, 41, 42, 43, 45, 46, 47 y 48. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos incluye no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de la secuencia ilustrativa expuesta en SEQ ID NOS: 90 y 44. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos incluye no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia ilustrativa expuesta en SEQ ID NOS:87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 41, 42, 43, 45, 46, 47 y 48. Por lo tanto, las realizaciones de la invención incluyen proteína de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en SEQ ID NOS: 90 y 44. Por consiguiente, las realizaciones de la solicitud incluyen una proteína de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en SEQ ID NOS:87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 41, 42, 43, 45, 46, 47 y 48. En ciertas realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende una CDR2 de las cadenas ligeras y/o de las cadenas pesadas. En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en SEQ ID NOS: 82 y 36. En algunas descripciones, la proteína de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en SEQ ID NOS:79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 33, 34, 35, 37, 38, 39 y 40. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos incluye no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de la secuencia ilustrativa expuesta en SEQ ID NOS: 82 y 36. En ciertas descripciones, la secuencia de aminoácidos incluye no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de la secuencia ilustrativa expuesta en SEQ ID NOS: 79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 33, 34, 35, 37, 38, 39 y 40. Por lo tanto, las realizaciones de la invención incluyen una proteína de unión al antígeno que es por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en SEQ ID NOS: 82 y 36. Por lo tanto, las descripciones de la solicitud incluyen una proteína de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en SEQ ID NOS: 79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 33, 34, 35, 37, 38, 39 y 40.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende una CDR1 de las cadenas ligeras y/o las cadenas pesadas. En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en SEQ ID NOS:74 y 28. En algunas descripciones, la proteína de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias expuestas en SEQ ID NOS:71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 25, 26, 27, 29, 30, 31 y 32. En determinadas

realizaciones, la secuencia de aminoácidos incluye no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de la secuencia ilustrativa expuesta en SEQ ID NOS: 74 y 28. En ciertas descripciones la secuencia de aminoácidos incluye no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco o no más de seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de la secuencia ilustrativa expuesta en SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 25, 26, 27, 29, 30, 31 y 32. Por lo tanto, las realizaciones de la invención incluyen una proteína de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias expuestas en SEQ ID NOS: 74 y 28. Por consiguiente, las descripciones de la solicitud incluyen una proteína de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias expuestas en SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 25, 26, 27, 29, 30, 31 y 32.

Las proteínas de unión a antígenos de la invención comprenden los andamios de anticuerpos tradicionales, incluidos anticuerpos humanos y monoclonales, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados en este documento "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, fusiones de anticuerpos (algunas veces denominadas "conjugados de anticuerpos") y fragmentos de cada uno, respectivamente. Las CDR descritas previamente, incluidas varias combinaciones de las CDR, se pueden injertar en cualquiera de los siguientes andamios.

Tal como se emplea en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a las diversas formas de proteínas monoméricas o multiméricas que comprenden una o más cadenas de polipéptidos que se unen específicamente a un antígeno, como se describe de diversas formas en la presente invención. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se producen por técnicas de ADN recombinantes. En realizaciones adicionales, los anticuerpos se producen por escisión enzimática o química de anticuerpos naturales. En otro aspecto, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: a) un anticuerpo humano; b) un anticuerpo humanizado; c) un anticuerpo quimérico; d) un anticuerpo monoclonal; e) un anticuerpo policlonal; f) un anticuerpo recombinante; g) un fragmento de unión a antígenos; h) un anticuerpo monocatenario; i) un diacuerpo; j) un triacuerpo, k) un tetracuerpo, l) un fragmento Fab; m) un fragmento F(ab')₂, n) un anticuerpo IgA, o) un anticuerpo IgD, p) un anticuerpo IgE, q) un anticuerpo IgG1, r) un anticuerpo IgG2, s) un anticuerpo IgG3, t) un anticuerpo IgG4 y u) un anticuerpo IgM.

Una región variable comprende por lo menos tres CDR de las cadenas pesadas o ligeras incorporadas dentro de la región marco (designadas regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4). Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD. Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está típicamente compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, en donde cada par tiene una cadena "ligera" y una cadena "pesada". La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gama, alfa o épsilon, y definen el isotipo de anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, entre ellas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene algunas subclases, entre ellas IgM1 e IgM2. Las realizaciones de la invención incluyen todas esas clases y subclases de anticuerpos que incorporan un dominio variable o CDR de las proteínas de unión al antígeno, como se describe en este documento.

Algunos anticuerpos naturales, como aquellos que se hallan en camellos y llamas, son dímeros que consisten en dos cadenas pesadas y no incluyen cadenas ligeras. La solicitud describe anticuerpos diméricos de dos cadenas pesadas o sus fragmentos, que se pueden unir a CD27L.

Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras típicamente exhiben la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, es decir las regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR son principalmente responsables del reconocimiento y la unión a antígenos. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean mediante las regiones marco, permitiendo la unión a un epítipo específico. De N-terminal a C-terminal, ambas cadenas pesada y ligera comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de conformidad con las definiciones de Kabat.

Las CDR constituyen los puntos de contacto superficial principales para la unión a los antígenos. La CDR3 o la cadena ligera y, particularmente, la CDR3 de la cadena pesada pueden constituir los determinantes más importantes en la unión a antígenos dentro de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas. En algunos anticuerpos, la CDR3 de la cadena pesada parecer constituir el área principal de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Los esquemas

de selección *in vitro* en donde CDR3 sola varía, se pueden usar para variar las propiedades de unión de un anticuerpo o determinar qué residuos contribuyen a la unión de un antígeno.

Los anticuerpos naturales típicamente incluyen una secuencia de señalización, que dirige el anticuerpo hacia la vía celular para segregación de proteínas y que típicamente no está presente en el anticuerpo maduro. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención puede codificar una secuencia de señalización natural o una secuencia de señalización heteróloga como se describe a continuación.

En una realización, la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo que comprende entre una y seis de las CDR ilustrativas descritas en este documento. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier tipo, incluidos IgM, IgG (como anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA o IgE. En una realización específica, la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo de tipo IgG, p. ej., un anticuerpo IgG1.

En algunas realizaciones, por ejemplo cuando la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo con cadenas pesadas y ligeras completas, las CDR son todas de la misma especie, p. ej., humana. Alternativamente, por ejemplo en realizaciones en las que la proteína de unión al antígeno contiene menos de seis CDR de las secuencias señaladas anteriormente, las CDR adicionales pueden ser o bien de otras especies o pueden ser CDR humanas diferentes de aquellas descritas en las secuencias ilustrativas. Por ejemplo, se pueden usar las regiones HCDR3 y LCDR3 de las secuencias apropiadas identificadas en este documento, en donde HCDR1, HCDR2, LCDR1 y LCDR2 se seleccionan opcionalmente entre especies alternativas de anticuerpos humanos diferentes, o sus combinaciones. Por ejemplo, las CDR de la invención pueden reemplazar las regiones CDR de anticuerpos comercialmente relevantes quiméricos o humanizados.

Las realizaciones específicas utilizan componentes de andamiaje de las proteínas de unión a antígenos que son componentes humanos. En algunas realizaciones, no obstante, los componentes de andamiaje pueden consistir en una mezcla de distintas especies. Como tal, si la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo, dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto "anticuerpos quiméricos" como "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" tradicionalmente comprenden una o más regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y la región o regiones constantes de un ser humano.

"Anticuerpos humanizados" se refiere en general a anticuerpos no humanos que han tenido regiones marco de dominio variable intercambiadas por secuencias que se hallan en anticuerpos humanos. En general, en un anticuerpo humanizado, todo el anticuerpo, excepto una o más CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto dentro de una o más CDR. Las CDR, algunas o todas de las cuales son codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en el marco de la lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad es determinada por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, p. ej., en el documento WO 92/11018, Jones 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536. Los anticuerpos humanizados pueden también generarse usando ratones con un sistema inmune genéticamente modificado. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. En las realizaciones ilustrativas descritas en este documento, las CDR identificadas son humanas, y por lo tanto los anticuerpos humanizados como quiméricos en este contexto incluyen algunas CDR no humanas, por ejemplo, se pueden generar anticuerpos humanizados que comprenden las regiones HCDR3 y LCDR3, en donde una o más de otras regiones CDR tienen un origen de especie diferente.

En una realización, la proteína de unión al antígeno CD27L es un anticuerpo multiespecífico, y notablemente un anticuerpo biespecífico, algunas veces denominados "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se unen a dos o más antígenos diferentes o epítopos diferentes en una sola proteína. En determinadas realizaciones, un anticuerpo específico se une a un anticuerpo biespecífico CD27L y un antígeno en una célula efectora humana (p. ej., célula T). Dichos anticuerpos son útiles en direccionar la respuesta de una célula efectora contra células que expresan CD27L, tal como una célula tumoral. En realizaciones preferidas, el antígeno de la célula efectora humana es CD3. Patente de EE. UU. núm. 7.235.641. Los métodos para elaborar anticuerpos específicos se conocen en la técnica. Uno de dichos métodos implica modificar la porción Fc de las cadenas pesadas como para crear "perillas" y "orificios" que facilitan la formación de heterodímeros de las cadenas pesadas cuando se co-expresan en una célula. Documento U.S. 7.695.963. Otro método también implica modificar la porción Fc de la cadena pesada, pero usa encauzamiento mecánico para promover la formación de heterodímeros mientras desalienta la formación de homodímeros de las cadenas pesadas cuando se co-expresan en una célula. WO 09/089.004.

En una realización, la proteína de unión al antígeno CD27L es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas de tipo anticuerpo minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio CH3. Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061.

En una realización, la proteína de unión al antígeno CD27L es un anticuerpo de dominio; ver, por ejemplo, la patente de EE. UU. núm. 6.248.516. Los anticuerpos de dominio (dAb) son dominios de unión funcionales de anticuerpos, correspondientes a las regiones variables o bien de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de anticuerpos humanos. Los dAb tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 13 kDa, o menos de un décimo del tamaño de un anticuerpo completo. Los dAb se expresan en una diversidad de hospedantes, incluidos sistemas de células

bacterianas, de levadura y mamíferas. Además, los, dAb son muy estables y retienen la actividad, incluso después de someterse a condiciones rigurosas, tales como liofilización o desnaturalización térmica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; EE. UU. serie núm. 2004/0110941; patente europea 0368684; patentes de EE. UU. 6.696.245, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609.

5 En una realización, la proteína de unión al antígeno CD27L es un fragmento de anticuerpos, que es un fragmento de cualquiera de los anticuerpos señalados en este documento que retienen la especificidad de unión hacia CD27L. En diversas realizaciones, las proteínas de unión al antígeno comprenden, aunque sin limitarse a ello, un fragmento F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv, o fragmentos Fv monocatenarios. Como mínimo, un anticuerpo, como se entiende en este documento, comprende un polipéptido que se une específicamente a CD27L que comprende todo o parte de una
10 región variable de las cadenas ligeras o pesadas, como una o más CDR.

Otros ejemplos de fragmentos de anticuerpos de unión a CD27L incluyen, aunque sin limitarse a ello, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CHI, (ii) el fragmento Fd consiste en los dominios VH y CHI, (iii) el fragmento Fv consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546) que consiste en una sola variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están enlazados por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:5879-5883), (viii) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos (WO 93/011161) y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por la fusión de genes (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:6444-6448). Los fragmentos de anticuerpos se pueden modificar. Por ejemplo, las moléculas se pueden estabilizar por la incorporación de puentes disulfuro enlazando los dominios VH y VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245). Los aspectos de la invención incluyen realizaciones en las que los componentes no CDR de estos fragmentos son secuencias humanas.

25 En una realización, la proteína de unión al antígeno CD27L es un anticuerpo totalmente humano. En esta realización, como se señaló anteriormente, las estructuras específicas comprenden cadenas ligeras y pesadas completas representadas que comprenden regiones CDR. Realizaciones adicionales utilizan una o más de las CDR de la invención, en donde las otras CDR, regiones marco, y regiones J y D, regiones constantes, etc., provienen de anticuerpos humanos. Por ejemplo, las CDR de la invención pueden reemplazar a las CDR de cualquier número de anticuerpos humanos, particularmente anticuerpos comercialmente relevantes.

Los anticuerpos monocatenarios se pueden formar enlazando fragmentos de dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas (región Fv) mediante un puente de aminoácidos (enlazador de péptidos cortos), que resulta en una sola cadena de polipéptidos. Dichos Fv de cadena sencilla (scFv) se han preparado condensando ADN que codifica un enlazador peptídico entre los ADN que codifican dos polipéptidos de dominio variable (VL y VH). Los polipéptidos resultantes se pueden volver a plegar en sí mismos para formar monómeros de unión a antígenos, o pueden formar multímeros (p. ej., dímeros, trímeros o tetrámeros), dependiendo de la longitud de un enlazador flexible entre los dos dominios variables (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Al combinar diferentes polipéptidos que comprenden VL y VH, se pueden formar scFv multiméricos que se unen a distintos epítopos (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos monocatenarios incluyen aquellas descritas en la patente de EE. UU. núm. 4.946.778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87. Los anticuerpos monocatenarios derivados de anticuerpos que se dan a conocer en este documento (entre ellos scFv que comprenden combinaciones de dominios variables de Ab4 LCv/Ab4 HCv (SEQ ID NO:66/SEQ ID NO:20 y sus combinaciones se abarcan en la presente invención. Los anticuerpos monocatenarios derivados de los anticuerpos que se dan a conocer en este documento (entre ellos scFv que comprenden las combinaciones de dominios variables de Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:63/SEQ ID NO:17), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:64/SEQ ID NO:18), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:65/SEQ ID NO:19), Ab5 LCv/Ab5 HCv (SEQ ID NO:67/SEQ ID NO:21), Ab6 LCv/Ab6 HCv (SEQ ID NO:68/SEQ ID NO:22), Ab7 LCv/Ab7 HCv (SEQ ID NO:69/SEQ ID NO:23), Ab8 LCv/Ab8 HCv (SEQ ID NO:70/SEQ ID NO:24), y sus combinaciones se describen en la presente solicitud.

50 En una realización, la proteína de unión al antígeno CD27L es una proteína de fusión al anticuerpo (algunas veces denominada en este documento "conjugado de anticuerpo"). La combinación de conjugado puede ser proteinácea o no proteinácea; esta última en general se genera usando grupos funcionales en la proteína de unión al antígeno y en la combinación del conjugado. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a una sustancia química no proteinácea (fármaco) para formar un conjugado de anticuerpo y fármaco. Los conjugados de anticuerpo y fármaco ilustrativos y los métodos para preparar dichos conjugados se analizan a continuación.

En una realización, la proteína de unión al antígeno CD27L es un análogo de anticuerpos, algunas veces denominado "anticuerpos sintéticos". Por ejemplo, una diversidad de trabajos utiliza o bien andamios de proteínas alternativos o andamios artificiales con CDR injertadas. Dichos andamios incluyen, aunque sin limitarse a ello, mutaciones introducidas para estabilizar la estructura tridimensional de la proteína de unión, además de andamios completamente sintéticos que consisten, por ejemplo, en polímeros biocompatibles. Véanse, por ejemplo, Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volumen 53, Edición 1:121-129. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog.

20:639-654. Además, se pueden emplear miméticos de anticuerpos peptídicos ("PAM"), así como también trabajos basados en miméticos de anticuerpos que utilizan componentes de fibronectina como un andamio.

5 Por "proteína", tal como se emplea en este documento, se entiende por lo menos dos aminoácidos covalentemente unidos, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. En algunas realizaciones, los dos aminoácidos covalentemente unidos están unidos por un enlace peptídico. La proteína puede estar conformada por aminoácidos naturales y enlaces peptídicos, por ejemplo cuando la proteína se prepara en forma recombinante usando sistemas de expresión y células hospedantes, como se señala a continuación. Alternativamente, la proteína puede incluir aminoácidos sintéticos (p. ej., homofenilalanina, citrulina, ornitina y norleucina), o estructuras peptidomiméticas, es decir, "análogos de péptidos o proteínas", como peptoides (véase, Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:9367), que pueden ser resistentes a proteasas u otras condiciones fisiológicas y/o de almacenamiento. Dichos aminoácidos sintéticos se pueden incorporar en particular cuando la proteína de unión al antígeno se sintetiza *in vitro* por métodos convencionales conocidos en la técnica. Además, se puede utilizar cualquier combinación de residuos/estructuras naturales. "Aminoácido" también incluye residuos de aminoácidos tales como prolina e hidroxiprolina. El "grupo R" o la "cadena lateral" del aminoácido pueden tener la configuración (L) o (S). En una realización específica, los aminoácidos tienen la configuración (L) o (S).

20 En ciertos aspectos, la invención da a conocer proteínas de unión a antígenos recombinantes que se unen a CD27L y, en algunas realizaciones, un CD27L humano recombinante o su porción. En este contexto, una "proteína recombinante" es una proteína elaborada usando cualquier técnica recombinante y métodos conocidos en el campo, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante descrito en este documento. Los métodos y técnicas para la producción de proteínas recombinantes se conocen en el campo. Las realizaciones de la invención incluyen proteínas de unión a antígenos recombinantes que se unen a CD27L de tipo salvaje y sus variantes.

"Que consiste esencialmente en" significa que la secuencia de aminoácidos puede variar en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15% en relación a la secuencia de SEQ ID NO: mencionada e incluso retiene la actividad biológica, como se describe en este documento.

25 En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno de la invención consiste en proteínas aisladas o proteínas sustancialmente puras. Una proteína "aislada" no está acompañada por al menos algún material con el cual se asocia normalmente en su estado natural, por ejemplo que constituye por lo menos aproximadamente 5% o por lo menos aproximadamente 50% en peso de la proteína total en una muestra determinada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir entre 5 y 99,9% en peso del contenido de proteína total, dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, la proteína puede prepararse en una concentración mayor mediante el uso de un promotor inducible o un promotor de expresión superior, de modo tal que la proteína se prepare a niveles de concentración mayores. La definición incluye la producción de una proteína de unión al antígeno en una amplia diversidad de organismos y/o células hospedantes conocidos en la técnica.

35 Para secuencias de aminoácidos, la identidad y/o similitud de secuencia se determina usando técnicas convencionales conocidas en el campo, entre ellas el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, el algoritmo de alineación de secuencia de identidad de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. EE. UU. 85:2444, las implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, preferiblemente usando configuraciones por defecto, o por inspección. Preferiblemente, el porcentaje de identidad se calcula por FastDB en base a los siguientes parámetros: penalización de incompatibilidad de 1; penalización de espacio de 1; penalización de tamaño de espacio de 0,33; y penalización de unión de 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pág 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

50 Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones de a pares progresivas. También puede graficar un árbol que muestra las tres relaciones de agrupaciones utilizadas para crear la alineación. PILEUP emplea una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; el método es similar a aquel descrito por Higgins y Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Los parámetros PILEUP útiles incluyen un peso de espacio por defecto de 3,00, un peso de longitud de espacio por defecto de 0,10 y espacios terminales ponderados.

55 Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; y Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:5873-5787. Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales configuran valores por defecto. Los parámetros ajustables se configuran con los siguientes valores: lapso de superposición =1, fracción de superposición =0,125, umbral de palabra (T)=11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son establecidos por el programa propiamente dicho dependiendo de la composición de la secuencia particular y de la composición de la base de datos particular contra la cual se está buscando la secuencia de interés; no obstante, los valores se pueden ajustar para aumentar la sensibilidad.

5 Un algoritmo útil adicional es gapped BLAST como lo indican Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. Gapped BLAST utiliza calificaciones de sustitución BLOSUM-62; el parámetro de umbral T configurado a 9; el método de dos hits para desencadenar extensiones no espaciadas, longitudes de espacio de cargas de k un costo de 10+k; X_u configurado a 16, y X_g configurado a 40 para la etapa de búsqueda de la base de datos y a 67 para la etapa de producción de los algoritmos. Las alineaciones espaciadas son desencadenadas por una puntuación correspondiente a aproximadamente 22 bits.

10 En general, la homología, similitud o la identidad de la secuencia de ácido nucleico entre CDR variantes individuales son por lo menos 80% a las secuencias ilustradas en este documento, y más típicamente preferiblemente con homologías o identidades en aumento de por lo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y prácticamente 100%. En un modo similar, "porcentaje (%) de identidad de la secuencia de ácido nucleico" con respecto a la secuencia de ácido nucleico de las proteínas de unión identificadas en este documento se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de nucleótidos en la secuencia codificante de la proteína de unión al antígeno. Un método específico utiliza el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 configurado a los parámetros por defecto, con un lapso de superposición y una fracción de superposición configurados a 1 y 0,125, respectivamente.

15 En general, la homología, similitud o identidad de la secuencia de ácidos nucleicos entre las secuencias de nucleótidos que codifican CDR variantes individuales y la secuencia de nucleótidos ilustrada en este documento son por lo menos 80%, y más típicamente con aumento de las homologías o identidades de por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% y prácticamente 100%.

20 Por consiguiente, una "CDR variante" es una con la homología, similitud o identidad especificada a la CDR madre de la invención, y comparte la función biológica, entre otros, por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la especificidad y/o actividad de la CDR madre.

25 Si bien el sitio o la región para introducir una variación de secuencia de aminoácidos se predetermina, la mutación *per se* no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, con el fin de optimizar el desempeño de una mutación en un sitio determinado, se puede llevar a cabo mutagénesis aleatoria en el codón o la región diana y detectar las variantes CDR de proteínas de unión expresadas para la combinación óptima de la actividad deseada. Las técnicas para elaborar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN se conocen bien, por ejemplo, mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis PCR. La detección de los mutantes se realiza usando ensayos de actividades de proteínas de unión a antígenos, como unión a CD27L.

30 Las sustituciones de aminoácidos son típicamente residuos individuales; las inserciones usualmente se harán en el orden de aproximadamente uno (1) a aproximadamente veinte (20) residuos de aminoácidos, aunque se pueden tolerar inserciones considerablemente mayores. Las eliminaciones oscilan entre aproximadamente uno (1) y aproximadamente veinte (20) residuos de aminoácidos, aunque en algunos casos las eliminaciones pueden ser mucho más grandes.

35 Las sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquiera de sus combinaciones se pueden usar en un derivado o variante final. En general, estos cambios se realizan en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula, particularmente la inmunogenicidad y especificidad de la proteína de unión al antígeno. No obstante, se pueden tolerar cambios mayores en determinadas circunstancias. Las sustituciones conservadoras en general se realizan de conformidad con el siguiente cuadro que se ilustra como Tabla 1.

Tabla 1

Residuo original	Sustituciones ilustrativas
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn

Residuo original	Sustituciones ilustrativas
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Los cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica se realizan seleccionando sustituciones que son menos conservadoras que aquellas que se muestran en la Tabla 1. Por ejemplo, se pueden efectuar sustituciones que afectan más significativamente: la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la alteración, por ejemplo la estructura alfa-helicoidal o de lámina beta; la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera produzcan los mayores cambios de las propiedades del polipéptido son aquellas en las que (a) un residuo hidrófobo se sustituye con un residuo hidrófilo, p. ej., serilo o treonilo, (o viceversa), p. ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituyen con cualquier otro residuo (o viceversa); (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, p. ej., lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye con un residuo electronegativo (o viceversa), p. ej., glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, p. ej., fenilalanina, se sustituye con uno que no tiene una cadena lateral (o viceversa), p. ej., glicina.

Las variantes típicamente exhiben la misma actividad biológica cualitativa y producirán la misma respuesta inmune que el análogo natural, aunque también se seleccionan variantes para modificar las características de las proteínas de unión a antígenos según sea necesario. Alternativamente, la variante se puede diseñar de manera tal que se altere la actividad biológica de la proteína de unión al antígeno. Por ejemplo, los sitios de glucosilación se pueden alterar o eliminar como se señala en este documento.

Otros derivados de anticuerpos CD27L de la solicitud incluyen conjugados covalentes y agregativos de anticuerpos CD27L, o sus fragmentos, con otras proteínas o polipéptidos, como por expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos condensadas al término C o al término N de un polipéptido de anticuerpo CD27L. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido de señal heteróloga (o líder), p. ej., el líder del factor alfa de levadura, o un péptido tal como una marca de epítipo. Las proteínas de fusión que contienen el anticuerpo CD27L pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación del anticuerpo CD27L (p. ej., poly-His). Un polipéptido del anticuerpo CD27L también puede enlazarse al péptido FLAG como se describe en Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988, y en la patente estadounidense 5.011.912. El péptido FLAG es altamente antigénico y proporciona un epítipo reversiblemente unido por un anticuerpo monoclonal específico (mAb), que permite el rápido ensayo y la fácil purificación de la proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en las que el péptido FLAG se condensa a un polipéptido determinado se comercializan (Sigma, St. Louis, MO).

Los oligómeros que contienen uno o más polipéptidos de anticuerpo CD27L se pueden emplear como antagonistas de CD27L. Los oligómeros pueden tener la forma de dímeros, trímeros u oligómeros superiores covalentemente enlazados o no covalentemente enlazados. Los oligómeros que comprenden dos o más polipéptidos de anticuerpo CD27L se contemplan para uso, en donde un ejemplo es un homodímero. Otros oligómeros incluyen heterodímeros, homotrímeros, heterotrímeros, homotetrámeros, heterotetrámeros, etc.

Una realización se refiere a oligómeros que comprenden múltiples polipéptidos de anticuerpo CD27L unidos mediante interacciones covalentes o no covalentes entre restos de péptidos condensados a los polipéptidos de anticuerpo CD27L. Dichos péptidos pueden ser enlaces peptídicos (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de promover la oligomerización. Las cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos están entre los péptidos que pueden promover la oligomerización del anticuerpo CD27L unido a este, como se describe en más detalle a continuación.

En realizaciones particulares, los oligómeros comprenden entre dos y cuatro polipéptidos del anticuerpo CD27L. Los restos de anticuerpo CD27L del oligómero pueden estar en cualquiera de las formas descritas en las reivindicaciones anejas. Preferiblemente, los oligómeros comprenden polipéptidos del anticuerpo CD27L que tienen actividad de unión a CD27L.

En una realización, un oligómero se prepara usando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. Se ha descrito la preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos condensados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluido el dominio Fc), p. ej., por Ashkenazi et al., 1991, PNAS EE. UU. 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; y Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Supl. 4, páginas 10.19.1 - 10.19.11.

Una realización de la presente invención se refiere a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creadas condensando un fragmento de unión de CD27L de un anticuerpo CD27L a la región Fc de un anticuerpo. El dímero se puede preparar, por ejemplo, insertando la fusión de un gen que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, expresando la fusión del gen en células hospedantes transformadas con el vector de expresión recombinante y permitiendo que la proteína de fusión expresada se ensamble tal como las moléculas de anticuerpo, en donde los enlaces disulfuro intercatenarios se forman entre los restos Fc para producir el dímero.

La expresión "polipéptido de Fc", tal como se emplea en la presente memoria, incluye formas nativas y de muteína de los polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. Se incluyen también las formas truncadas de dichos polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden restos Fc (y oligómeros formados a partir de allí) ofrecen la ventaja de fácil purificación por cromatografía de afinidad frente a las columnas de Proteína A o Proteína G.

Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido monocatenario que se extiende desde la región bisagra N-terminal al término C nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína de Fc descrita en la patente de EE. UU. 5.457.035 y en Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a aquella de la secuencia Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 ha sido cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 ha sido cambiado de Leu a Glu y el aminoácido 22 ha sido cambiado de Gly a Ala. La muteína exhibe menor afinidad hacia los receptores de Fc.

En otras realizaciones, la porción variable de las cadenas pesadas y/o ligeras de un anticuerpo CD27L se puede sustituir con la porción variable de una cadena pesada y/o ligera del anticuerpo.

Alternativamente, el oligómero es una proteína de fusión que comprende múltiples polipéptidos del anticuerpo CD27L, con o sin enlazadores peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los enlazadores peptídicos adecuados se encuentran aquellos descritos en las patentes de EE. UU. 4.751.180 y 4.935.233.

Otro método para preparar derivados de anticuerpos CD27L oligoméricos implica el uso de una cremallera de leucina. La cremallera de leucina consiste en péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en donde se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión al ADN (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), y desde entonces se hallaron en una diversidad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran los péptidos naturales y sus derivados que se dimerizan o trimerizan. Los ejemplos de dominios de cremalleras de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de proteína de tensorioactivo de pulmón D (SPD) descrita en Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga condensada a esta se describe en Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. En un planteamiento, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden el fragmento de anticuerpo CD27L o derivado condensado a un péptido de la cremallera de leucina se expresan en células hospedantes adecuadas, y los fragmentos o derivados de anticuerpos CD27L oligoméricos solubles que se forman se recuperan del sobrenadante de cultivo.

Las modificaciones covalentes de las proteínas de unión a antígenos se incluyen dentro del alcance de la presente invención, y en general, aunque no siempre, se realizan post-traducción. Por ejemplo, varios tipos de modificaciones covalentes de la proteína de unión al antígeno se introducen en la molécula, sometiendo a reacción residuos de aminoácidos específicos de la proteína de unión al antígeno con un agente de derivación orgánica capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas de residuos N o C terminales.

Los residuos cisteinilo más comúnmente reaccionan con α -haloacetatos (y aminos correspondientes), como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo

también se derivan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozoil)propiónico, cloroacetil fosfato, N-alquilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

5 Los residuos histidilo derivan por reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 dado que este agente es relativamente específico para la cadena lateral histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo es también útil; la reacción preferiblemente se lleva a cabo en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

10 Los residuos terminales lisinilo y amino se someten a reacción con anhídridos de ácido succínico u otro ácido carboxílico. La derivación con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como metil picolinimidato; piridoxal fosfato; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada con transaminasa con glixilato.

15 Los residuos arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de residuos arginina requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas debido al alto pK_a del grupo funcional guanidina. Asimismo, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como también con el grupo arginina épsilon-amino.

20 Se puede efectuar la modificación específica de los residuos tirosilo, con particular interés en introducir etiquetas espectrales en los residuos tirosilo por reacción con compuestos de diazonilo aromáticos o tetranitrometano. Más comúnmente, se utilizan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosilo se yodina usando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas etiquetadas para uso en un radioinmunoensayo, en donde es adecuado el método de cloramina T descrito anteriormente.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidias ($R'-N=C=N-R'$), en donde R y R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinilo-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. A su vez, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten a residuos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.

25 La derivación con agentes bifuncionales es útil para reticular proteínas de unión a antígenos a una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en una diversidad de métodos. Los agentes de reticulación habitualmente utilizados incluyen, p. ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluidos ésteres disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los
30 agentes de derivación tales como metil -3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato producen intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. En forma alternativa, las matrices insolubles en agua reactivas tales como bromuro de cianógeno-carbohidratos activados y los sustratos reactivos descritos en las patentes estadounidenses núm. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 se emplean para inmovilización de proteínas.

35 Los residuos glutaminilo y asparaginilo frecuentemente se desamidam a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente. Alternativamente, estos residuos se desamidam bajo condiciones ligeramente ácidas. Cualquiera de las formas de estos residuos yace dentro del alcance de la presente invención.

40 Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, metilación de las cadenas laterales de los grupos α -amino de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pág. 79-86), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

45 Otro tipo de modificación covalente de la proteína de unión al antígeno incluida dentro del alcance de la presente invención comprende alterar el patrón de glucosilación de la proteína. Como se conoce en la técnica, los patrones de glucosilación pueden depender de la secuencia de la proteína (p. ej., la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos de glucosilación particular, que se analiza en lo sucesivo), o la célula hospedante o el organismo en el que se produce la proteína. Los sistemas de expresión particulares se analizan a continuación.

50 La glucosilación de polipéptidos habitualmente se enlaza en N o se enlaza en O. Que se enlaza en N hace referencia a la sujeción del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tri-péptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para sujeción enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral asparagina. Por consiguiente, la presente de estas secuencias de tri-péptidos en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. Que se enlaza en O hace referencia a la sujeción de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente a serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

55 La adición de sitios de glucosilación a la proteína de unión al antígeno se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma tal que contenga una o más de las secuencias de tri-péptidos anteriormente descritas (para sitios de glucosilación enlazados en N). La alteración también se puede efectuar con la adición o

sustitución de uno o más residuos serina o treonina a la secuencia de partida (para sitios de glucosilación enlazados en O). Para facilidad, la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al antígeno preferiblemente se altera a través de cambios al nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas de modo tal que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

5 Otro medio de aumentar el número de restos carbohidrato en la proteína de unión al antígeno es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos en el sentido que no requieren la producción de la proteína en una célula hospedante que posee capacidades de glucosilación para glucosilación enlazada en N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares se pueden adjuntar a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como aquellos de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como aquellos de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como aquellos de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pág. 259-306.

15 La eliminación de restos carbohidrato presentes en la proteína de unión al antígeno de partida se puede lograr química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que se deja el polipéptido intacto. La desglucosilación química es descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de los restos carbohidrato sobre los polipéptidos se puede lograr con el uso de una diversidad de endo y exo-glucosidasas como lo describen Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glucosilación en sitios de glucosilación potenciales se puede prevenir con el uso de del compuesto tunicamicina, como lo describen Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glucósido.

25 Otro tipo de modificación covalente de la proteína de unión al antígeno comprende el enlace de la proteína de unión al antígeno a varios polímeros no proteináceos, entre ellos varios polioles tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, en la forma expuesta en las patentes de EE. UU. núm. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. A su vez, como se sabe en la técnica, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en distintas posiciones dentro de la proteína de unión al antígeno para facilitar la adición de polímeros tales como PEG.

30 En algunas realizaciones, la modificación covalente de las proteínas de unión a antígenos de la invención comprende la adición de una o más etiquetas.

35 La expresión "grupo de etiquetado" significa cualquier etiqueta detectable. Los ejemplos de grupos de etiquetado adecuados incluyen, aunque sin limitarse a ello: radioisótopos o radionúclidos (p. ej., ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), grupos fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, lantánido fósforos), grupos enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotínico o epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión al metal, marcas de epítopos). En algunas realizaciones, el grupo de etiquetado se acopla a la proteína de unión al antígeno mediante brazos espaciadores de longitudes variables para reducir el impedimento estérico potencial. Se conocen en la técnica diversos métodos para etiquetar proteínas y se pueden usar en la realización de la presente invención.

40 En general, las etiquetas se categorizan en una diversidad de clases, dependiendo del ensayo en el que se detecten: a) etiquetas isotópicas, que pueden ser radiactivas o isótopos pesados; b) etiquetas magnéticas (p. ej., partículas magnéticas); c) restos activos de reducción oxidativa; d) tintes ópticos; grupos enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinizados; y f) epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión al metal, marcas de epítopos, etc.). En algunas realizaciones, el grupo de etiquetado se acopla a la proteína de unión al antígeno mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. Se conocen en la técnica diversos métodos para etiquetar proteínas conocidas en la técnica y se pueden usar en la implementación de la presente invención.

50 Las etiquetas específicas incluyen tintes ópticos, entre ellos, crómoforos, fósforos y fluoróforos, en donde estos últimos son específicos en muchos casos. Los fluoróforos puede ser fluoros de "moléculas pequeñas" o fluoros proteináceos.

55 Por "etiqueta fluorescente" se entiende cualquier molécula que se puede detectar mediante sus propiedades fluorescentes inherentes. Las etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a ello, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde Malacite, estilbena, Amarillo Lucifer, Azul Cascade J, Rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, Rojo LC 640, Cy 5, Cy 5.5, Rojo LC 705, verde Oregon, tintes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Azul Cascade, Amarillo Cascade y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamina y Rojo Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Los tintes ópticos adecuados, incluidos fluoróforos, se describen en Molecular Probes Handbook por Richard P. Haugland.

Las etiquetas fluorescentes proteináceas adecuadas también incluyen, aunque sin limitarse a ello, proteína fluorescente verde, incluida una especie Renilla, Ptilosarcus o Aequorea de GFP (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., número de acceso en Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferasa (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β galactosidasa (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:2603-2607) y Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, patentes de EE. UU. núm. 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

10 Polinucleótidos que codifican proteínas de unión a antígenos CD27L

En la presente invención se abarcan ácidos nucleicos que codifican proteínas de unión a antígenos CD27L, incluidos anticuerpos, como se define en este documento. Los ácidos nucleicos preferidos incluyen aquellos que codifican las cadenas ligeras y pesadas ilustrativas descritas en este documento.

15 Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab1 LC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:49.

Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab2 LC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:50.

Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab4 LC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:51.

20 Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab5 LC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:52.

Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab6 LC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:53.

25 Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab7 LC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:54.

Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab8 LC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:55.

Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab1 HC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:3.

30 Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab2 HC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:4.

Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab4 HC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:5.

35 Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab5 HC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:6.

Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab6 HC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:7.

Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab7 HC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:8.

40 Un ácido nucleico ilustrativo que codifica Ab8 HC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:9.

Los aspectos de la invención incluyen variantes de polinucleótidos (p. ej., debido a degeneración) que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en este documento.

45 Los aspectos de la invención incluyen una diversidad de métodos que incluyen, aunque sin limitarse a ello, las siguientes realizaciones ilustrativas.

Un polinucleótido aislado, en donde dicho polinucleótido codifica uno o más polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

A. 1. una secuencia de dominio variable de las cadenas ligeras que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de dominio variable de las cadenas ligeras expuesta en SEQ ID NOs:63-70;

2. una secuencia de dominio variable de las cadenas pesadas que es por lo menos 90% idéntica a una secuencia de dominio variable de las cadenas pesadas expuesta en SEQ ID NOs:17-24;

3. un dominio variable de las cadenas ligeras de (1) y un dominio variable de las cadenas pesadas de (2); y

5 B. un dominio variable de las cadenas ligeras que comprende CDR1, CDR2, CDR3 y/o un dominio variable de las cadenas pesadas que comprende CDR1, CDR2, CDR3 que difieren por no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos en cada CDR de las siguientes secuencias:

4. una CDR1 de las cadenas ligeras (SEQ ID NO:74), CDR2 (SEQ ID NO:82), CDR3 (SEQ ID NO:90) o una CDR1 de las cadenas pesadas (SEQ ID NO:28), CDR2 (SEQ ID NO:36), CDR3 (SEQ ID NO:44) de Ab4;

10 "B" también describe un dominio variable de las cadenas ligeras que comprende una CDR1, CDR2, CDR3 y/o un dominio variable de las cadenas pesadas que comprende una CDR1, CDR2, CDR3 que difieren por no más de un total de tres adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos en cada CDR de las siguientes secuencias:

1. una CDR1 (SEQ ID NO:71), CDR2 (SEQ ID NO:79), CDR3 (SEQ ID NO:87) de las cadenas ligeras o una CDR1 (SEQ ID NO:25), CDR2 (SEQ ID NO:33), CDR3 (SEQ ID NO:41) de las cadenas pesadas de Ab1;

15 2. una CDR1 (SEQ ID NO:72), CDR2 (SEQ ID NO:80), CDR3 (SEQ ID NO:88) de las cadenas ligeras o una CDR1 (SEQ ID NO:26), CDR2 (SEQ ID NO:34), CDR3 (SEQ ID NO:42) de las cadenas pesadas de Ab2;

3. una CDR1 (SEQ ID NO:73), CDR2 (SEQ ID NO:81), CDR3 (SEQ ID NO:89) de las cadenas ligeras o una CDR1 (SEQ ID NO:27), CDR2 (SEQ ID NO:35), CDR3 (SEQ ID NO:43) de las cadenas pesadas de Ab3;

4. una CDR1 (SEQ ID NO:75), CDR2 (SEQ ID NO:83), CDR3 (SEQ ID NO:91) de las cadenas ligeras o una CDR1 (SEQ ID NO:29), CDR2 (SEQ ID NO:37), CDR3 (SEQ ID NO:45) de las cadenas pesadas de Ab5;

20 5. una CDR1 (SEQ ID NO:76), CDR2 (SEQ ID NO:84), CDR3 (SEQ ID NO:92) de las cadenas ligeras o una CDR1 (SEQ ID NO:30), CDR2 (SEQ ID NO:38), CDR3 (SEQ ID NO:46) de las cadenas pesadas de Ab6;

6. una CDR1 (SEQ ID NO:77), CDR2 (SEQ ID NO:85), CDR3 (SEQ ID NO:93) de las cadenas ligeras o una CDR1 (SEQ ID NO:31), CDR2 (SEQ ID NO:39), CDR3 (SEQ ID NO:47) de las cadenas pesadas de Ab7; y

25 7. una CDR1 (SEQ ID NO:78), CDR2 (SEQ ID NO:86), CDR3 (SEQ ID NO:94) de las cadenas ligeras o una CDR1 (SEQ ID NO:32), CDR2 (SEQ ID NO:40), CDR3 (SEQ ID NO:48) de las cadenas pesadas de Ab8.

En realizaciones preferidas, el polipéptido codificado por el ácido nucleico aislado es un componente de una proteína de unión al antígeno que se une a CD27L.

30 Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos descritas en este documento, que se han de usar como sondas o cebadores para el aislamiento de ácidos nucleicos o como secuencias problema (*query*) para búsquedas de bases de datos, se pueden obtener por "traducción inversa" de las secuencias de aminoácidos, o por identificación de regiones de identidad de aminoácidos con polipéptidos para los cuales se ha identificado la secuencia de ADN codificante. El procedimiento conocido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede emplear para aislar y ampliar una secuencia de ADN que codifica las proteínas de unión a antígenos CD27L o una combinación deseada de fragmentos de polipéptidos de proteínas de unión antígenos CD27L. Los oligonucleótidos que definen los términos de la combinación de fragmentos de ADN se emplean como cebadores 5' y 3'. Los oligonucleótidos pueden adicionalmente contener sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, a fin de facilitar la inserción de la combinación ampliada de fragmentos de ADN en un vector de expresión. Las técnicas PCR se describen en Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pág. 189-196; y *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

45 Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ADN y ARN tanto en la forma monocatenaria como bicatenaria, además de las correspondientes secuencias complementarias. El ADN incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintetizado químicamente, ADN ampliado por PCR y sus combinaciones. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen genes de longitud total o moléculas de ADNc, además de una combinación de sus fragmentos. Los ácidos nucleicos de la invención preferiblemente derivan de fuentes humanas, pero la invención incluye también aquellas especies derivadas de no humanos.

50 Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que se ha separado de las secuencias genéticas adyacentes presentes en el genoma del organismo del cual se aisló el ácido nucleico, en el caso de ácidos nucleicos aislados de fuentes naturales. En el caso de ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente de un molde o químicamente, tal como los productos PCR, moléculas de ADNc u oligonucleótidos, por ejemplo, se entiende que los ácidos nucleicos que resultan de dichos procesos son ácidos nucleicos aislados. Una molécula de ácido nucleico aislado se refiere a una molécula de ácido nucleico en la forma de un fragmento separado o como un componente de un constructo de ácido nucleico más grande. En una realización preferida, los ácidos nucleicos están sustancialmente libres de material endógeno contaminante. La molécula de ácido nucleico preferiblemente deriva de ADN o ARN aislado por lo menos

una vez en forma prácticamente pura y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación y recuperación de sus secuencias de nucleótidos componentes por métodos bioquímicos estándar (como aquellos señalados en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Dichas secuencias preferiblemente son provistas y/o construidas en la forma de un marco de lectura abierto ininterrumpido por secuencias no traducidas internas, o intrones, que están típicamente presentes en genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducido pueden estar presentes 5' o 3' de un marco de lectura abierto, en donde las mismas no interfieren con la manipulación o expresión de la región codificante.

La presente invención también incluye ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones moderadamente rigurosas, y más preferiblemente condiciones altamente rigurosas, a ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión a antígenos CD27L como se describe en este documento. Los parámetros básicos que afectan la opción de las condiciones y lineamientos de hibridación para diseñar condiciones adecuadas se exponen por Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11; y *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4), y los expertos en la técnica los pueden determinar fácilmente en base a, por ejemplo, la longitud y/o composición base del ADN. Una forma de lograr condiciones moderadamente rigurosas implica el uso de una disolución de prelavado que contiene 5 x SSC, 0,5% SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de aproximadamente 50% formamida, 6 x SSC y una temperatura de hibridación de aproximadamente 55 grados C (u otras disoluciones de hibridación similares, como una que contiene aproximadamente 50% formamida, con una temperatura de hibridación de aproximadamente 42 grados C), y condiciones de lavado de aproximadamente 60 grados C, en 0,5 x SSC, 0,1% SDS. En general, las condiciones de gran rigurosidad que se definen como condiciones de hibridación como anteriormente, pero con lavado a aproximadamente 68 grados C, 0,2 x SSC, 0,1% SDS. SSPE (1xSSPE es NaCl 0,15M, NaH 10 mM.sub.2 PO.sub.4 y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) se pueden sustituir con SSC (1xSSC es NaCl 0,15M y citrato sódico 15 mM) en la hibridación y tampones de lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de completar la hibridación. Se ha de entender que la temperatura de lavado y la concentración salina del lavado se pueden ajustar según sea necesario para lograr un grado deseado de rigurosidad aplicando los principios básicos que rigen las reacciones de hibridación y la doble estabilidad, como conocen los expertos en la técnica y como se describe a continuación (véase, p. ej., Sambrook et al., 1989). Cuando se hibrida un ácido nucleico a un ácido nucleico diana de secuencia desconocida, se asume que la longitud del híbrido es aquella del ácido nucleico hibridante. Cuando se hibridan ácidos nucleicos de secuencia conocida, la longitud del híbrido se puede determinar alineando las secuencias de los ácidos nucleicos e identificando la región o regiones de complementariedad de secuencias óptima. La temperatura de hibridación de los híbridos que se anticipa que tienen menos de 50 pares de bases de longitud debe ser 5 a 10 grados C menos que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, en donde T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, T_m (grados C) = $2(\# \text{ de bases A} + \text{T}) + 4(\# \text{ de bases G} + \text{C})$. Para los híbridos anteriores de 18 pares de bases de longitud, T_m (grados C) = $81,5 + 16,6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{ G} + \text{C}) - (600/\text{N})$, en donde N es el número de bases en el híbrido, y $[\text{Na}^+]$ es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ($[\text{Na}^+]$ para 1xSSC = 0,165M). Preferiblemente, cada uno de dichos ácidos nucleicos de hibridación tiene una longitud que es de por lo menos 15 nucleótidos (o más preferiblemente por lo menos 18 nucleótidos, o por lo menos 20 nucleótidos o por lo menos 25 nucleótidos, o por lo menos 30 nucleótidos, o por lo menos 40 nucleótidos, o lo más preferiblemente por lo menos 50 nucleótidos), o por lo menos 25% (más preferiblemente por lo menos 50%, o por lo menos 60%, o por lo menos 70%, y lo más preferiblemente por lo menos 80%) de longitud del ácido nucleico de la presente invención al cual se hibrida, y tiene por lo menos 60% identidad de secuencia (más preferiblemente por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%, y lo más preferiblemente por lo menos 99,5%) con el ácido nucleico de la presente invención al cual se hibrida, en donde la identidad de secuencia se determina comparando las secuencias de los ácidos nucleicos hibridantes cuando se alinean como para maximizar la superposición y la identidad mientras se minimizan los espacios de las secuencias según se describió en más detalle previamente.

Las variantes de acuerdo con la invención se preparan comúnmente por mutagénesis específica del sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína de unión al antígeno, usando mutagénesis PCR o cassette u otras técnicas conocidas en el campo, para producir ADN que codifica la variante, y de allí en más expresar el ADN recombinante en un cultivo celular como se señala en este documento. No obstante, los fragmentos de proteínas de unión a antígenos que comprenden CDR variantes que tienen hasta 100-150 residuos se pueden preparar por síntesis *in vitro* usando técnicas establecidas. Las variantes típicamente exhiben la misma actividad biológica cualitativa que el análogo natural, p. ej., unión a CD27L, aunque también pueden seleccionarse variantes que tengan características modificadas, como se señala en más detalle a continuación.

Como apreciarán los expertos en la técnica, debido a la degeneración del código genético, se puede elaborar un número extremadamente grande de ácidos nucleicos, los cuales codifican todos los CDR (y las cadenas pesadas y ligeras u otros componentes de la proteína de unión al antígeno) de la presente invención. Por lo tanto, habiendo identificado una secuencia de aminoácidos particular, los expertos en la técnica podrían preparar cualquier número de ácidos nucleicos diferentes, simplemente modificando la secuencia de uno o más codones en un modo que no cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

La presente invención también da a conocer sistemas de expresión y constructos en la forma de plásmidos, vectores de expresión, cassettes de transcripción o expresión que comprenden por lo menos un polinucleótido como se mencionó anteriormente. Además, la invención da a conocer células hospedantes que comprenden dichos sistemas de expresión o constructos.

5 Típicamente, los vectores de expresión utilizados en cualquiera de las células hospedantes contendrán secuencias para mantenimiento de plásmidos y para clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Dichas secuencias, conjuntamente denominadas "secuencias flanqueantes" en ciertas realizaciones típicamente incluirán una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia de intrones completos que contiene un donante y un sitio de empalme aceptor, una secuencia que codifica una secuencia líder para segregación de polipéptidos, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de polienlazador para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se ha de expresar y un elemento marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se analiza a continuación.

15 Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica una "marca", es decir, una molécula de oligonucleótido localizada en el extremo 5' o 3' de la proteína de unión al antígeno CD27L que codifica la secuencia; la secuencia de oligonucleótidos que codifica polyHis (como hexaHis), u otra "marca" tal como FLAG, HA (virus gripal hemaglutinina), o *myc*, para la cual existen anticuerpos comerciales. Esta marca típicamente se condensa al polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como medio para purificación de afinidad o detección de la proteína de unión al antígeno CD27L de la célula hospedante. Una purificación de afinidad se puede llevar a cabo, por ejemplo, por cromatografía en columna usando anticuerpos contra la marca como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la marca puede posteriormente quitarse de la proteína de unión al antígeno CD27L purificada por distintos medios tal como usando ciertas peptidasas para escisión.

25 Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedante), heterólogas (es decir, de una especie distinta que la especie o cepa de la célula hospedante), híbrida (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de un origen), sintéticas o nativas. Como tal, el origen de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procarionta o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier vegetal, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional y pueda ser activada por la maquinaria de la célula hospedante.

30 Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores de la presente invención se pueden obtener por varios métodos conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias flanqueantes útiles en este documento habrán sido previamente identificadas por mapeo y/o digestión de endonucleasas de restricción y pueden por lo tanto aislarse de la fuente de tejido correcta usando endonucleasas de restricción adecuadas. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos total de una secuencia flanqueante puede ser conocida. Aquí, la secuencia flanqueante se puede sintetizar usando los métodos descritos en el presente documento para síntesis o clonación de ácido nucleico.

35 Ya sea que se conozca toda o solamente una porción de una secuencia flanqueante, se puede obtener usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o detectando una biblioteca genómica con una sonda adecuada tal como un oligonucleótido y/o un fragmento de una secuencia flanqueante de la misma especie o de otra. Si no se conoce la secuencia flanqueante, se puede aislar un fragmento de ADN que contenga una secuencia flanqueante de una porción mayor de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento se puede lograr por digestión de endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN correcto seguido de aislamiento usando purificación de gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA), u otros métodos conocidos por el experto en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para lograr este propósito será obvia para el experto en la técnica.

45 Un origen de replicación es típicamente una parte de aquellos vectores de expresión procariontas adquiridos comercialmente, y los auxiliares de origen en la ampliación del vector en una célula hospedante. Si el vector de elección no contiene un origen del sitio de replicación, podría sintetizarse uno químicamente en base a una secuencia conocida, y ligarse al vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, y varios orígenes víricos (p. ej., SV40, polioma, adenovirus, virus de estomatitis vesicular (VSV), o papilomavirus tales como HPV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células mamíferas. En general el origen del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión mamíferos (por ejemplo, el origen SV40 a menudo se utiliza solamente porque también contiene el promotor temprano del virus).

55 Una secuencia de terminación de la transcripción típicamente está localizada en 3' hacia el extremo de una región codificante de polipéptidos y sirve para terminar la transcripción. Usualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariontas es un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia poly-T. Si bien la secuencia se clona fácilmente de una biblioteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, puede también sintetizarse fácilmente usando métodos para síntesis de ácido nucleico tales como aquellos descritos en este documento.

Un gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento en una célula hospedante desarrollada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células hospedantes procariotas; (b) deficiencias autoxtróficas del complemento de la célula; o (c) nutrientes críticos de suministro no disponibles del complejo o medio definido. Los marcadores seleccionables específicos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. Ventajosamente, un gen de resistencia a neomicina puede también utilizarse para selección tanto en células hospedantes procariotas como eucariotas.

Se pueden utilizar otros genes seleccionables para ampliar el gen que se expresará. La ampliación es el proceso en el que los genes que se requieren para la producción de una proteína crítica para el crecimiento o la supervivencia celular se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células mamíferas incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y genes timidina cinasa sin promotores. Los transformantes de células mamíferas se disponen bajo presión de selección en donde solamente los transformantes se adaptan de forma única para sobrevivir en virtud del gen seleccionable presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas bajo condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se aumenta sucesivamente, provocando de este modo la ampliación tanto del gen seleccionable como del ADN que codifica otro gen, como un anticuerpo de la proteína de unión al antígeno que se une al polipéptido CD27L. Como resultado, el aumento de las cantidades de un polipéptido tal como una proteína de unión al antígeno CD27L se sintetiza del ADN ampliado.

Un sitio de unión al ribosoma es usualmente necesario para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). El elemento se localiza típicamente 3' hacia el promotor y 5' hacia la secuencia codificante del polipéptido que se ha de expresar. En determinadas realizaciones, una o más regiones codificantes pueden estar operativamente enlazadas a un sitio de unión al ribosoma (IRES), permitiendo la traducción de dos marcos de lectura abierto de un solo transcrito de ARN.

En algunos casos, tales como cuando se desea glucosilación en un sistema de expresión de células hospedantes eucariotas, se pueden manipular las diversas pre- o pro-secuencias para mejorar la glucosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de peptidasa de un péptido de señalización particular, o añadir pro-secuencias, que también pueden afectar la glucosilación. El producto de proteína final puede tener, en la posición -1 (en relación al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales incidentes a la expresión, que pueden no haber sido totalmente eliminados. Por ejemplo, el producto de proteína final puede tener uno o dos residuos de aminoácidos que se encuentren en el sitio de escisión de peptidasa, sujetos al término amino. De forma alternativa, el uso de algunos sitios de escisión de enzimas puede resultar en una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima se corta en dicha área dentro del polipéptido maduro.

Los vectores de expresión y clonación de la invención típicamente contendrán un promotor que es reconocido por el organismo hospedante y está operativamente enlazado a la molécula que codifica la proteína de unión al antígeno CD27L. Los promotores son secuencias no transcritas localizadas en dirección 5' al codón de partida de un gen estructural (en general dentro de aproximadamente 100 a 1000 bp) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles en aumento de transcripción de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitutivos, por otra parte, transcriben de manera uniforme el gen al que están operativamente enlazados, es decir, con poco o ningún control sobre la expresión génica. Se conoce un gran número de promotores, reconocido por una diversidad de células hospedantes potenciales. Un promotor adecuado está operativamente enlazado al ADN que codifica una cadena ligera o una cadena pesada que comprende una proteína de unión al antígeno CD27L de la invención, eliminando el promotor del ADN de origen por digestión de enzimas de restricción e insertando la secuencia del promotor deseada en el vector.

Los promotores adecuados para uso con hospedantes de levadura también se conocen en la técnica. Los potenciadores de levadura se utilizan ventajosamente con promotores de levadura. Los promotores adecuados para uso con células hospedantes mamíferas se conocen bien e incluyen, aunque sin limitarse a ello, aquellos obtenidos de los genomas de virus tales como polioma virus, virus de la viruela aviar, adenovirus (como Adenovirus 2), papiloma virus bovino, sarcoma virus aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de hepatitis B y lo más preferiblemente virus simio 40 (SV40). Otros promotores mamíferos adecuados incluyen promotores mamíferos heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y promotor de actina.

Los promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, aunque sin limitarse a ello: promotor temprano SV40 (Benoit y Chambon, 1981, Nature 290:304-310); promotor CMV (Thorsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. EE. UU. 81:659-663); el promotor contenido en la repetición 3' terminal larga del virus de sarcoma Rous (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797); promotor de herpes timidina cinasa (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 78:1444-1445); promotor y secuencias reguladoras del gen de metalotionina Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42); y promotores procariotas tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 75:3727-3731); o el promotor de tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 80:21-25). Son también de interés las siguientes regiones de control de la transcripción animal, que exhiben especificidad del tejido y

se han utilizado en animales transgénicos: la región control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); la región control del gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); la región control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); la región control del virus de tumores mamarios de ratones que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495); la región control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1 :268-276); la región control del gen de alfa-feto-proteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 253:53-58); la región control del gen alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171); la región control del gen beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); la región control del gen de proteína mielina básica que es activa en oligodendrocitos del cerebro (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); la región control del gen de la cadena ligera de miosina 2 que es activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, Nature 314:283-286); y la región control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que es activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Se puede insertar una secuencia mejorada en el vector para aumentar la transcripción de ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada que comprende una proteína de unión al antígeno CD27L de la invención por eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en cis, usualmente de aproximadamente 10-300 bp de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la posición y la orientación, habiéndose descubierto en las posiciones 5' y 3' hacia la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes mamíferos (p. ej., globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Típicamente, no obstante, se utiliza un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma y los potenciadores de adenovirus conocidos en la técnica son elementos potenciadores ilustrativos para la activación de promotores eucariotas. Si bien un potenciador puede posicionarse en el vector o bien 5' o 3' hacia una secuencia codificante, se localiza típicamente en un sitio 5' desde el promotor. Se puede incorporar una secuencia que codifica una secuencia de señalización nativa o heteróloga apropiada (secuencia líder o péptido de señalización) en un vector de expresión, para promover la segregación extracelular del anticuerpo. La elección del péptido de señalización o líder depende del tipo de células hospedantes en las que se producirá el anticuerpo, y una secuencia de señalización heteróloga puede reemplazar a la secuencia de señalización nativa. Los ejemplos de péptidos de señalización que son funcionales en células hospedantes mamíferas incluyen los siguientes: la secuencia de señalización para interleucina 7 (IL-7) descrita en la patente estadounidense núm. 4.965.195; la secuencia de señalización para el receptor de interleucina 2 descrita en Cosman et al., 1984, Nature 312:768; el péptido de señalización del receptor de interleucina 4 descrito en la patente EP núm. 0367 566; el péptido de señalización del receptor de interleucina I de tipo 1 descrito en la patente de EE. UU. núm. 4.968.607; el péptido de señalización de interleucina I de tipo II descrito en la patente EP núm. 0 460 846.

El vector puede contener uno o más elementos que faciliten la expresión cuando el vector se integra en el genoma de la célula hospedante. Los ejemplos incluyen un elemento EASE (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) y una región de sujeción a la matriz (MAR). Las MAR median la organización estructural de la cromatina y pueden aislar el vector integrado del efecto "posición". Por lo tanto, las MAR son particularmente útiles cuando el vector se usa para crear transfectantes estables. Se conoce en la técnica una serie de ácidos nucleicos que contienen MAR sintéticas, p. ej., patentes de EE. UU. núm. 6.239.328; 7.326.567; 6.177.612; 6.388.066; 6.245.974; 7.259.010; 6.037.525; 7.422.874; 7.129.062.

Los vectores de expresión de la invención se pueden construir a partir de un vector de partida, tal como un vector comercialmente disponible. Dichos vectores pueden o no contener todas las secuencias flanqueantes deseadas. Si una o más de las secuencias flanqueantes descritas en este documento ya no están presentes en el vector, pueden obtenerse individualmente y ligarse al vector. Los expertos en la técnica conocen los métodos utilizados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes.

Después de que se ha construido el vector y que se ha insertado una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, una cadena pesada, o una cadena ligera y una cadena pesada que comprenden una secuencia de unión al antígeno CD27L en el sitio correcto del vector, el vector completado se puede insertar en una célula hospedante adecuada para ampliación y/o expresión de polipéptidos. La transformación de un vector de expresión para una proteína de unión al antígeno CD27L en una célula hospedante seleccionada se puede llevar a cabo por métodos conocidos, incluida la transfección, infección, co-precipitación de fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por dextrano DEAE u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula hospedante a utilizar. El experto en la técnica conoce bien estos métodos y otros métodos adecuados, y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001, *supra*.

Una célula hospedante, cuando se cultiva bajo condiciones apropiadas, sintetiza una proteína de unión al antígeno CD27L que puede posteriormente recogerse del medio de cultivo (si la célula hospedante la segrega en el medio) o directamente de la célula hospedante que la produce (si no se segrega). La selección de una célula hospedante apropiada dependerá de varios factores, como los niveles de expresión deseados, las modificaciones del polipéptido que sean deseables o necesarias para la actividad (como glucosilación o fosforilación) y facilidad de plegado hacia una molécula biológicamente activa. Una célula hospedante puede ser eucariota o procariota.

Las líneas celulares mamíferas disponibles como hospedantes para expresión se conocen en la técnica e incluyen, aunque sin limitarse a ello, líneas celulares inmortalizadas disponibles de American Type Culture Collection (ATCC) y cualquier línea celular utilizada en un sistema de expresión conocido en la técnica para preparar los polipéptidos recombinantes de la invención. En general, las células hospedantes se transforman con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica un polipéptido de anticuerpo anti- CD27L deseado. Entre las células hospedantes que se pueden emplear están las células procariontas, de levadura o eucariotas superiores. Las procariontas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo *E. coli* o bacilli. Las células eucariotas superiores incluyen células de insectos y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de líneas celulares hospedantes mamíferas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados como Veggie CHO y líneas celulares relacionadas que se desarrollan en medio libre de suero (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10) y la línea celular CVI/EBNA derivada de la línea celular de mono verde africano CVI (ATCC CCL 70) como lo describen McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, células de riñón embrionario humano como 293, 293 EBNA o MSR 293, células epidérmicas humanas A431, células Colo205 humanas, líneas celulares de otros primates transformadas, células diploides normales, cepas de células derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, HL-60, U937, células HaK o Jurkat. Opcionalmente, las líneas celulares mamíferas tales como HepG2/3B, KB, NIH 3T3 o S49, por ejemplo, se pueden usar para expresión del polipéptido cuando es conveniente usar el polipéptido en varios ensayos indicadores o de transducción de señales. Alternativamente, es posible producir el polipéptido en eucariotas inferiores tales como levadura o en procariontas tales como bacterias. Las levaduras adecuadas incluyen cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Dichas cepas bacterianas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Si el polipéptido se prepara en levadura o bacterias, puede ser conveniente modificar el polipéptido producido allí, por ejemplo por fosforilación o glucosilación de los sitios apropiados, con el fin de obtener el polipéptido funcional. Dichas sujeciones covalentes se pueden lograr usando métodos químicos o enzimáticos conocidos. El polipéptido puede también producirse enlazando operativamente el ácido nucleico aislado de la invención a secuencias control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insectos, y empleando un sistema de expresión de insectos. Los materiales y métodos para sistemas de expresión de baculovirus/células de insectos se obtienen de fuentes comerciales en la forma de kits, p. ej., de Invitrogen, San Diego, Calif., EE. UU. (kit MaxBac®), y dichos métodos se conocen en la técnica, como se describe en Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station, Boletín núm. 1555 (1987), y Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Los sistemas de traducción libres de células podrían también emplearse para producir polipéptidos usando ARN derivados de los constructos de ácido nucleico descritos en este documento. Los vectores de clonación y expresión adecuados para uso con hospedantes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y mamíferos son descritos por Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, Nueva York, 1985). Una célula hospedante que comprende un ácido nucleico aislado de la invención, preferiblemente operativamente enlazado a por lo menos una secuencia de control de expresión, es una "célula hospedante recombinante".

En determinadas realizaciones, las líneas celulares se pueden seleccionar a través de la determinación de qué líneas celulares tienen niveles de expresión mayores y producen constitutivamente proteínas de unión a antígenos con propiedades de unión a CD27L. En otra realización, se puede seleccionar una línea celular del linaje de células B que no produce su propio anticuerpo sino que posee una capacidad de producir y segregar un anticuerpo heterólogo.

Conjugados de anticuerpo y fármaco

Las realizaciones de la invención incluyen conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC). En general, el ADC comprende un anticuerpo conjugado a un agente quimioterapéutico, p. ej., un agente citotóxico, un agente citostático, una toxina o un agente radiactivo. Se puede emplear una molécula enlazadora para conjugar el fármaco al anticuerpo. Se conoce en la técnica una amplia variedad de enlazadores y fármacos útiles en la tecnología de ADC y se pueden usar en las realizaciones de la presente invención. (Véanse los documentos US20090028856; US2009/0274713; US2007/0031402; WO2005/084390; WO2009/099728; US5208020; US5416064; US5475092; 5585499; 6436931; 6372738; y 6340701).

Los conjugados de anticuerpo y fármaco se pueden preparar por métodos *in vitro*. Con el fin de enlazar un fármaco o profármaco al anticuerpo, se usa un grupo enlazador. Los grupos enlazadores adecuados se conocen en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles peptidasa y grupos lábiles esterasa. Los grupos enlazadores preferidos son los grupos disulfuro. Por ejemplo, los conjugados se pueden construir usando una reacción de intercambio de disulfuro entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco. Las moléculas de fármaco también se pueden enlazar a un agente de unión a la célula a través de una molécula vehículo intermediaria tal como albúmina del suero.

En determinadas realizaciones, el agente de unión a la célula se modifica sometiendo a reacción un reactivo de reticulación bifuncional con el agente de unión a la célula, resultando de este modo en la sujeción covalente de una molécula enlazadora al agente de unión a la célula. Tal como se emplea en este documento, un "reactivo de reticulación bifuncional" o "enlazador" es cualquier resto químico que enlaza en forma covalente un agente de unión a la célula con un fármaco, como los fármacos descritos en este documento. En una realización particular de la

invención, una porción del resto enlazador es provista por el fármaco. En este sentido, el fármaco comprende un resto enlazador que es parte de una molécula enlazadora más grande que se usa para unir el agente de unión a la célula con el fármaco. Por ejemplo, para formar el maitansinoide DM1, la cadena lateral en el grupo hidroxilo C-3 de maitansina se modifica para tener un grupo sulfhidrilo libre (SH). Esta forma tiolada de maitansina puede reaccionar con un agente de unión a la célula modificado para formar un conjugado. En consecuencia, el enlazador se ensambla a partir de dos componentes, uno de los cuales es provisto por el reactivo de reticulación, mientras que el otro es provisto por la cadena lateral de DM1. Se puede emplear cualquier reactivo de reticulación bifuncional en relación con la invención, siempre y cuando el reactivo enlazador proporcione la retención del agente terapéutico, p. ej., citotoxicidad, y las características de direccionamiento del fármaco y el agente de unión a la célula, respectivamente. Preferiblemente, la molécula enlazadora une el fármaco al agente de unión a la célula a través de enlaces químicos (como se describió anteriormente), de manera tal que el fármaco y el agente de unión a la célula se acoplen químicamente (p. ej., se enlacen en forma covalente) uno con el otro.

Enlazadores

En determinadas realizaciones, el ADC comprende un enlazador compuesto por uno o más componentes enlazadores. Preferiblemente el fármaco se enlaza a un agente de unión a la célula a través de un enlace disulfuro. La molécula enlazadora comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con el agente de unión a la célula. Los grupos químicos reactivos preferidos para reacción con el agente de unión a la célula son N-succinimidil ésteres y N-sulfosuccinimidil ésteres. Además, la molécula enlazadora comprende un grupo químico reactivo, preferiblemente un grupo ditiopiridilo, que puede reaccionar con el fármaco para formar un enlace disulfuro. Las moléculas enlazadoras ilustrativas incluyen, por ejemplo, N-succinimidil 3-(2-piridiltio)propionato (SPDP) (véase, p. ej., Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173, 723-737 (1978)), N-succinimidil 4-(2-piridiltio)butanoato (SPDB) (véase, p. ej., la patente de EE. UU. núm. 4.563.304) y N-succinimidil 4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) (véase, p. ej., número de registro CAS 341498-08-6). Otros componentes enlazadores ilustrativos incluyen 6-maleimidocaproilo, maleimidopropanoilo, valina-citrulina, alanina-fenilalanina, p-aminobenciloxicarbonilo, y aquellos que resultan de la conjugación con reactivos enlazadores, entre ellos, N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC," también denominado en este documento "MCC"), y N-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB").

Los enlazadores pueden ser un enlazador "escindible" o un enlazador "no escindible" (Ducry y Stump, *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 5-13). Los enlazadores escindibles están diseñados para liberar el fármaco cuando se somete a ciertos factores ambientales, p. ej., cuando se internaliza en la célula diana. Los enlazadores escindibles incluyen enlazadores lábiles ácidos, enlazadores sensibles a proteasa, enlazadores fotolábiles, enlazador de dimetilo o enlazadores que contienen disulfuro. Los enlazadores no escindibles tienden a permanecer covalentemente asociados con por lo menos un aminoácido del anticuerpo y el fármaco tras la internalización y degradación dentro de la célula diana. Un enlazador no escindible es cualquier resto químico capaz de enlazar un fármaco, tal como un maitansinoide (p. ej., DM1, y similares), un taxano o un análogo de CC-1065, a un agente de unión a la célula en un modo estable y covalente. Por consiguiente, los enlazadores no escindibles son sustancialmente resistentes a escisión inducida por ácidos, escisión inducida por luz, escisión inducida por peptidasa, escisión inducida por esterasa y escisión de enlaces disulfuro, bajo condiciones en las que el fármaco o el agente de unión a la célula permanece activo.

Los reactivos de reticulación adecuados que forman enlazadores no escindibles entre un fármaco y el agente de unión a la célula se conocen en la técnica. Los ejemplos de enlazadores no escindibles incluyen enlazadores que tienen un resto N-succinimidil éster o N-sulfosuccinimidil éster para reacción con el agente de unión a la célula, además de un resto basado en maleimido o haloacetilo para reacción con el fármaco. Los reactivos enlazadores de reticulación que comprenden un resto basado en maleimido incluyen N-succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC--SMCC), N-succinimidil éster de ácido x- maleimidoundecanoico (KMUA), N-succinimidil éster de ácido .gamma.-maleimidobutírico (GMBS), N-hidroxisuccinimida éster de ácido épsilon.-maleimidocaproico (EMCS), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), N-(.alfa.-maleimidoacetoxi)-succinimida éster (AMAS), succinimidil-6-(.beta.-maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), N-succinimidil 4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB) y N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI). Los reactivos de reticulación que comprenden un resto basado en haloacetilo incluyen N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), N-succinimidil yodoacetato (SIA), N-succinimidil bromoacetato (SBA) y N-succinimidil 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP). Un enlazador no escindible preferido ilustrativo es MCC.

Otros enlazadores reactivos de reticulación que carecen de un átomo de azufre que forman enlazadores no escindibles también se puede utilizar en el método de la invención. Dichos enlazadores pueden derivar de restos basados en ácido dicarboxílico. Los restos basados en ácido dicarboxílico adecuados incluyen, aunque sin limitarse a ello, ácidos alfa,omega-dicarboxílicos de la fórmula general (IX):



en donde X es un grupo alquilo, alqueno o alquino lineal o ramificado que tiene 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalqueno que porta 3 a 10 átomos de carbono, Z es un grupo aromático sustituido o insustituido que porta 6 a 10 átomos de carbono, o un grupo heterocíclico sustituido o insustituido en el que el heteroátomo se

selecciona entre N, O S, y en donde l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que l, m y n no sean todos cero al mismo tiempo.

Muchos de los enlazadores no escindibles descritos en este documento se describen en detalle en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2005/0169933 A1.

5 Los ejemplos de enlazadores escindibles adecuados incluyen enlazadores disulfuro, enlazadores lábiles ácidos, enlazadores fotolábiles, enlazadores lábiles peptidasa y enlazadores lábiles esterasa. Los enlazadores que contienen disulfuro son enlazadores escindibles a través del intercambio de disulfuro, que puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas. Los enlazadores lábiles ácidos son enlazadores escindibles a pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimientos intracelulares, como los endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5), y proporcionan condiciones adecuadas para escindir enlazadores lábiles ácidos. Los enlazadores fotolábiles son útiles en la superficie corporal y en muchas cavidades corporales que son accesibles a la luz. Asimismo, la luz infrarroja puede penetrar el tejido. Los enlazadores lábiles peptidasa se pueden usar para escindir ciertos péptidos dentro o fuera de las células (véanse, p. ej., Trouet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 79, 626-629 (1982), y Umemoto et al., Int. J. Cancer, 43, 677-684 (1989)).

15 Fármacos

En determinadas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN.TM.); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metileniminas y metilamelaminas incluidas trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán); brioestatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; nitrógeno mostazas tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uracil mostaza; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocin, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediyne (p. ej., calicamicina, especialmente calicamicina .gamma1 y calicamicina teta I, véase, p. ej., Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dinemicina, incluida dinemicina A; una esperamicina; además del cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibiótico de cromoproteína enediyne relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina; cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluida morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, nitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidin, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador del ácido fólico, como ácido frolinico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfomitina; acetato de eliptinio; una epitilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK.RTM.; razoxana; rizoxina; sizofurán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquna; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente T-2 toxina, verracurin A, roridina A y anguidina); uretán; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL.TM., Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE.RTM., Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de la hormona sobre tumores, como anti-estrógenos, incluidos por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; siRNA y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Otros agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar con la presente invención se describen en la publicación estadounidense núm. 20080171040 o en la publicación estadounidense núm. 20080305044.

Se contempla que un anticuerpo puede conjugarse a dos o más agentes quimioterapéuticos distintos, o una composición farmacéutica puede comprender una mezcla de anticuerpos en donde el componente de anticuerpo es

idéntico excepto por conjugarse a un agente quimioterapéutico diferente. Dichas realizaciones pueden ser útiles para dirigir múltiples rutas biológicas con una célula diana.

En realizaciones preferidas, el ADC comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas maitansinoides, que son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. Los maitansinoides, incluidas diversas modificaciones, se describen en las patentes de EE. UU. núm. 3896111; 4151042; 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; 4371533; and WO 2009/099728. Los restos del fármaco maitansinoide se pueden aislar de fuentes naturales, producidas usando tecnología recombinante, o se pueden preparar en forma sintética. Los maitansinoides ilustrativos incluyen C-19-decloro (patente de EE. UU. núm. 4256746), C-20-hidroxi (o C-20-demetil) +/- C-19-decloro (patentes de EE. UU. núm. 4307016 y 4361650), C-20-demetoxi (o C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (patente de EE. UU. núm. 4294757), C-9-SH (patente de EE. UU. núm. 4.424.219), C-14-alcóximetilo (demetoxi/CH₂OR) (patente de EE. UU. núm. 4.331.598), C-14-hidroximetilo oaciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (patente de EE. UU. núm. 4.450.254), C-15-hidroxi/aciloxi (patente de EE. UU. núm. 4.364.866), C-15-metoxi (patentes de EE. UU. núm. 4.313.946 y 4.315.929), C-18-N-demetilo (patentes de EE. UU. núm. 4.362.663 y 4.322.348) y 4,5-desoxi (patente de EE. UU. núm. 4.371.533).

Se pueden usar varias posiciones en los compuestos maitansinoides como la posición de enlace, dependiendo del tipo de enlace deseado. Por ejemplo, para formar un enlace éster, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo son todas adecuadas (patentes estadounidenses núm. 5208020, RE39151 y 6913748; publicaciones de solicitudes de patentes estadounidenses núm. 20060167245 y 20070037972, y WO 2009099728).

Los maitansinoides preferidos incluyen aquellos conocidos en la técnica como DM1, DM3 y DM4 (publ. de solicitudes de patentes de EE. UU. núm. 2009030924 y 20050276812).

Los ADC que contienen maitansinoides, los métodos para elaborar dichos ADC y su uso terapéutico se describen en las patentes de EE. UU. núm. 5208020 y 5416064, publ. de solicitud de patente de EE. UU. núm. 20050276812, y WO 2009099728. Los enlazadores útiles para elaborar ADC de maitansinoides se conocen en la técnica (patente de EE. UU. núm. 5208020 y publ. de solicitudes de patentes de EE. UU. núm. 2005016993 y 20090274713). Los ADC de maitansinoides que comprenden un enlazador SMCC se pueden preparar como se describe en la publicación de patente de EE. UU. núm. 2005/0276812.

En determinadas realizaciones, el ADC comprende un anticuerpo conjugado a DM1 con un enlazador de SMCC. Las realizaciones preferidas incluyen Ab4-SMCC-DM1. Algunas realizaciones incluyen Ab1-SMCC-DM1, Ab2-SMCC-DM1, Ab3-SMCC-DM1, Ab5-SMCC-DM1, Ab6-SMCC-DM1, Ab7-SMCC-DM1 y Ab8-SMCC-DM1.

Carga del fármaco

Un ADC puede tener 1 a 20 agentes quimioterapéuticos por anticuerpo. Las composiciones de ADC se pueden caracterizar por el número promedio de restos de fármaco por molécula de anticuerpo en la composición. El número promedio de restos de fármaco se puede determinar por medios convencionales tales como espectrometría de masas, inmunoensayo y HPLC. En algunos casos, una población de ADC homogénea se puede separar y purificar mediante HPLC de fase inversa o electroforesis. Por lo tanto, las composiciones de ADC farmacéuticas pueden contener una población heterogénea u homogénea de anticuerpos enlazados a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más restos de fármaco.

En realizaciones preferidas, el ADC comprende un conjugado de anticuerpo a una o más moléculas DM1. Las realizaciones de la invención incluyen composiciones que comprenden un promedio de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20 moléculas DM1 por anticuerpo. Las composiciones de ADC preferidas son aquellas que comprenden un Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7 o Ab8 que tiene en promedio entre 1 y 10 DM1 moléculas por anticuerpo, aquellas que comprenden anticuerpos que tienen en promedio entre 3 y 7 moléculas DM1 por anticuerpo, y aquellas que comprenden anticuerpos que tienen en promedio entre 4 y 6 moléculas DM1, incluido un promedio de aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9 y aproximadamente 6,0 moléculas DM1 por anticuerpo.

Anticuerpos potenciados por la función efectora

Una de las funciones de la porción Fc de un anticuerpo consiste en comunicar al sistema inmune cuando el anticuerpo se une a su diana. Esto se considera "función efectora". La comunicación produce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). ADCC y ADCP son mediadas a través de la unión del Fc a los receptores de Fc en la superficie

de las células del sistema inmune. La CDC es mediada a través de la unión del Fc con proteínas del sistema del complemento, p. ej., C1q.

5 Las subclases de IgG varían en su capacidad de mediar las funciones efectoras. Por ejemplo, IgG1 es muy superior a IgG2 e IgG4 en mediar ADCC y CDC. Por consiguiente, en realizaciones en las que una célula que expresa CD27L se direcciona para destrucción, sería preferible un anticuerpo anti-CD27L IgG1.

10 La función efectora de un anticuerpo se puede incrementar, o reducir, introduciendo una o más mutaciones en el Fc. Las realizaciones de la invención incluyen proteínas de unión, p. ej., anticuerpos, que tienen un Fc modificado para aumentar la función efectora (U.S. 7.317.091 y Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009). Las moléculas IgG1 Fc ilustrativas que tienen mayor función efectora incluyen (en base al esquema de numeración Kabat) aquellas que tienen las siguientes sustituciones: S239D/I332E

S239D/A330S/I332E
 S239D/A330L/I332E
 S298A/D333A/K334A
 P247I/A339D
 15 P247I/A339Q
 D280H/K290S
 D280H/K290S/S298D
 D280H/K290S/S298V
 F243L/R292P/Y300L
 20 F243L/R292P/Y300L/P396L
 F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
 G236A/S239D/I332E
 K326A/E333A
 K326W/E333S
 25 K290E/S298G/T299A
 K290N/S298G/T299A
 K290E/S298G/T299A/K326E
 K290N/S298G/T299A/K326E

30 Otras realizaciones de la invención incluyen proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, que tienen un Fc modificado para reducir la función efectora. Las moléculas de Fc ilustrativas que tienen menos función efectora incluyen (en base al esquema de numeración Kabat) aquellas que tienen las siguientes sustituciones:

N297A (IgG1)
 L234A/L235A (IgG1)
 V234A/G237A (IgG2)
 35 L235A/G237A/E318A (IgG4)
 H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)
 C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
 C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)
 L234F/L235E/P331S (IgG1)
 40 S267E/L328F (IgG1)

Otro método para aumentar la función efectora de proteínas que contienen IgG Fc consiste en reducir la fucosilación del Fc. La eliminación de la fucosa del núcleo de los oligosacáridos de tipo complejo biantenarico unidos al Fc aumentó en gran medida la función efectora de ADCC sin alterar la unión al antígeno o la función efectora de CDC. Se conocen varias formas de reducir o suprimir la fucosilación de moléculas que contienen Fc, p. ej., anticuerpos. Estas incluyen expresión recombinante en ciertas líneas celulares mamíferas que incluyen una línea celular FUT8 inactivada, una línea de CHO variante Lec13, línea celular de hibridoma de rata YB2/0, una línea celular que comprende un ARN de interferencia pequeño específicamente contra el gen FUT8, y una línea celular que co-expresa B-1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III y Golgi α -manosidasa II. Alternativamente, la molécula que contiene Fc se puede expresar en una célula no mamífera como una célula vegetal, célula de levadura o procarionta, p. ej., E. coli. Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la invención, una composición comprende un anticuerpo, p. ej., Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7 o Ab8, que tiene menor fucosilación o que carece de fucosilación por completo.

Composiciones farmacéuticas

55 En algunas realizaciones, la invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o una pluralidad de las proteínas de unión al antígeno de la invención junto con un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante terapéuticamente eficaz. En determinadas realizaciones, la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo, incluido un anticuerpo conjugado a un fármaco o un anticuerpo biespecífico. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, aunque sin limitarse a ello, composiciones líquidas, congeladas y liofilizadas.

Preferiblemente, los materiales de formulación no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. En realizaciones específicas, se dan a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión al antígeno CD27L, p. ej., ADC de unión a CD27L.

5 En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. En dichas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, aunque sin limitarse a ello, aminoácidos (como glicina, glutamina, asparagina, arginina, prolina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (como ácido ascórbico, sulfito sódico o hidrógeno-sulfito sódico); tampones (como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (como manitol o glicina); agentes quelantes (como ácido etilendiamintetracético (EDTA)); agentes formadores de complejo (como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, saporíferos y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (como sodio); conservantes (como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agente humectantes (como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos como polisorbato 20, polisorbato, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (como sacarosa o sorbitol);
10
15
20 agentes potenciadores de tonicidad (como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol); vehículos para administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Ver, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica óptima será determinada por el experto en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la ruta de administración que se tenga como fin, el formato de administración y la dosis deseada. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra. En determinadas realizaciones, dichas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo* de las proteínas de unión al antígeno de la invención. En determinadas realizaciones, el vehículo primario en una composición farmacéutica puede ser o bien acuoso o no acuoso por naturaleza. Por ejemplo, un vehículo adecuado puede ser agua para inyección, disolución fisiológica o fluido cefalorraquídeo artificial, posiblemente enriquecido con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La disolución salina tamponada neutra o disolución salina mixta con albúmina de suero también otros vehículos ilustrativos. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón de acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, y pueden además incluir sorbitol o un sustituto adecuado para ello. En determinadas realizaciones de la invención, las composiciones de proteína de unión al antígeno CD27L se pueden preparar para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tenga el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra) en la forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, en determinadas realizaciones, el producto de proteína de unión al antígeno CD27L se puede formular como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.
25
30
35

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden seleccionar para administración parenteral. Alternativamente, las composiciones se pueden seleccionar para inhalación o para administración a través del tubo digestivo, como por vía oral. La preparación de dichas composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la experiencia en la técnica. Los componentes de formulación están presentes preferiblemente en concentraciones aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones, los tampones se utilizan para mantener la composición a pH o a pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.
40
45

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para uso en la presente invención se pueden proporcionar en la forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable, apirógena que comprende la proteína de unión al antígeno CD27L en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que la proteína de unión al antígeno CD27L se formula como una disolución estéril, isotónica, correctamente conservada. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), esferas o liposomas, que pueden proporcionar liberación controlada o sostenida del producto que se puede administrar por inyección de depósito. En determinadas realizaciones, se puede usar también ácido hialurónico, que tiene el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar dispositivos implantables de administración del fármaco para introducir la proteína de unión al antígeno deseada.
50
55

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para inhalación. En estas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos CD27L ventajosamente se formulan como un polvo inhalable seco. En realizaciones específicas, las disoluciones para inhalación de proteína de unión al antígeno CD27L pueden también formularse con un propulsor para administración en aerosol. En determinadas realizaciones, las disoluciones se pueden nebulizar. La administración pulmonar y los métodos de formulación se describen por lo tanto en más detalle en la publicación de
60

patente internacional núm. WO 1994/020069, que describe la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas.

5 También se contempla que las formulaciones se pueden administrar por vía oral. Las proteínas de unión al antígeno CD27L que se administran en este modo se pueden formular con o sin vehículos habitualmente utilizados en la preparación de formas de administración sólidas como comprimidos y cápsulas. En determinadas realizaciones, se puede diseñar una cápsula que libere la porción activa de la formulación en el punto del tubo digestivo en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación pre-sistémica. Se pueden incluir agentes adicionales que faciliten la absorción de la proteína de unión al antígeno CD27L. Se pueden emplear también diluyentes, saporíferos, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

10 Composiciones farmacéuticas adicionales serán obvias para el experto en la técnica, incluidas formulaciones que implican proteínas de unión al antígeno CD27L en formulaciones de administración sostenida o controlada. Los expertos en la materia también conocen las técnicas para formular una diversidad de otros medios de administración sostenida o controlada, como vehículos de liposomas, micropartículas bio-erosionables o esferas porosas e inyecciones de depósito. Véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional núm. WO 1993/015722, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para administración de composiciones farmacéuticas. Las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en la forma de partículas conformadas, p. ej., películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (como se describe en la patente de EE. UU. núm. 3.773.919 y en la publicación de solicitud de patente europea núm. EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gama etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 y Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etileno vinil acetato (Langer et al., 1981, supra) o ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico (publicación de solicitud de patente europea núm. EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida pueden también incluir liposomas que se pueden preparar por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 82:3688-3692; publicaciones de solicitudes de patentes europeas núm. EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

15 Las composiciones farmacéuticas utilizadas para administración *in vivo* típicamente se proveen como preparaciones estériles. La esterilización se puede lograr por filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización que usa este método se puede llevar a cabo o bien antes o después de la liofilización y reconstitución. Las composiciones para administración parenteral se pueden conservar en forma liofilizada o en una disolución. Las composiciones parenterales en general se disponen en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica.

20 Los aspectos de la invención incluyen formulaciones de la proteína de unión al antígeno CD27L auto-tamponadas, que se pueden emplear como composiciones farmacéuticas, como se describe en la solicitud de patente internacional WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599).

25 Como se analizó anteriormente, ciertas realizaciones dan a conocer composiciones de proteínas de unión a antígenos CD27L, particularmente composiciones de proteínas de unión a antígenos CD27L farmacéuticas, que comprenden, además de la proteína de unión al antígeno CD27L, uno o más excipientes tales como aquellos ilustrativamente descritos en esta sección y en otras partes de este documento. Los excipientes se pueden utilizar en la invención en este sentido para una amplia gama de propósitos, como ajuste de las propiedades físicas, químicas o biológicas de las formulaciones, como ajuste de viscosidad, y o procedimientos de la invención para mejorar la efectividad y o estabilizar dichas formulaciones y procedimientos contra degradación y deterioro debidos a, por ejemplo, el estrés que ocurre durante la fabricación, el envío, almacenamiento, preparación pre-uso, administración, y sucesivamente.

30 Una diversidad de exposiciones está disponible sobre estabilización de proteínas y materiales y métodos de formulación útiles en este sentido, como Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations", Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," en: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), y Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), particularmente en las partes pertinentes a excipientes y procesos de los mismos para formulaciones de proteínas auto-tamponadas de conformidad con la presente invención, especialmente en cuanto a productos farmacéuticos de proteínas y procesos para usos médicos veterinarios y/o humanos.

35 Se pueden usar sales de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, por ejemplo, para ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad de una formulación y/o para mejorar la solubilidad y/o estabilidad física de una proteína u otro ingrediente de una composición de acuerdo con la invención.

40 Como se sabe, los iones pueden estabilizar el estado nativo de las proteínas uniéndose a residuos cargados en la superficie de la proteína y produciendo grupos cargados y polares en la proteína y reduciendo la fuerza de sus interacciones electrostáticas, atractivas y repulsivas. Los iones pueden además estabilizar el estado desnaturado de una proteína uniéndose a, en particular, los enlaces de péptidos desnaturados (--CONH) de la proteína.

Asimismo, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína puede además reducir las interacciones electrostáticas intermoleculares y, prevenir o reducir así la agregación de proteínas y la insolubilidad.

5 Las especies iónicas difieren significativamente en sus efectos sobre las proteínas. Se ha desarrollado una serie de clasificaciones de iones y sus efectos sobre las proteínas que se pueden usar en la formulación de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Un ejemplo es la serie Hofmeister, que clasifica los solutos iónicos y polares no iónicos por su efecto sobre la estabilidad conformacional de las proteínas en disolución. La estabilización de solutos se denomina "kosmotrópica". La desestabilización de solutos se denomina "caotrópica". Los kosmotropos comúnmente se utilizan a altas concentraciones (p. ej., >1 molar sulfato de amonio) para precipitar las proteínas de la disolución ("eliminación de sales"). Los caotropos comúnmente se utilizan para desnaturalizar y/o solubilizar las proteínas ("incorporación de sales"). La efectividad relativa de los iones para "incorporar sales" y "eliminar sales" define su posición en la serie Hofmeister.

10 Se pueden usar aminoácidos libres en las formulaciones de proteínas de unión a antígenos CD27L de acuerdo con varias realizaciones de la invención como agentes que imparten volumen, estabilizantes y antioxidantes, además de otros usos convencionales. Se pueden usar lisina, prolina, serina y alanina para estabilizar proteínas en una formulación. La glicina es útil en la liofilización para asegurar la correcta estructura y propiedades de la torta. La arginina puede ser útil para inhibir la agregación de proteínas, tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas. La metionina es útil como antioxidante.

15 Los polioles incluyen azúcares, p. ej., manitol, sacarosa y sorbitol, y alcoholes polihídricos tales como, por ejemplo, glicerol y propilenglicol, y, para fines de análisis de la presente invención, polietilenglicol (PEG) y sustancias relacionadas. Los polioles son kosmotrópicos. Son agentes de estabilización útiles tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas para proteger proteínas contra procesos de degradación físico-química. Los polioles también son útiles para ajustar la tonicidad de las formulaciones.

20 Entre los polioles útiles en realizaciones selectas de la invención se encuentra el manitol, comúnmente utilizado para asegurar la estabilidad estructural de la torta en formulaciones liofilizadas. Asegura estabilidad estructural a la torta. En general se utiliza con un lioprotector, p. ej., sacarosa. Sorbitol y sacarosa están entre los agentes preferidos para ajustar la tonicidad y como estabilizadores para proteger contra el estrés de la liofilización durante el transporte o la preparación de cargas durante el proceso de fabricación. Reducir azúcares (que contienen grupos aldehído o cetona libres), como glucosa y lactosa, puede glicar los residuos lisina y arginina superficiales. Por lo tanto, en general no están entre los polioles preferidos para uso de acuerdo con la invención. Además, los azúcares que forman dichas especies reactivas, como sacarosa, se hidrolizan a fructosa y glucosa bajo condiciones ácidas, y en consecuencia generan, tampoco están entre los polioles preferidos de la invención en este sentido. PEG es útil para estabilizar proteínas y como crioprotector, y se puede usar en la invención en este sentido.

25 Las realizaciones de las formulaciones de proteínas de unión a antígenos CD27L comprenden además tensioactivos. Las moléculas de proteína pueden ser susceptibles a adsorción sobre superficies y a desnaturalización y consecuente agregación en superficies aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Estos efectos en general escalan de manera inversa con la concentración de proteína. Estas interacciones perjudiciales en general escalan en forma inversa con la concentración de proteína y típicamente se exacerban por agitación física, tal como aquella que se genera durante el envío y el manipuleo de un producto.

30 Los tensioactivos habitualmente se utilizan para prevenir, minimizar o reducir la adsorción superficial. Los tensioactivos útiles en la invención en este sentido incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácido graso de sorbitán polietoxilatos y poloxámero 188.

Los tensioactivos también se utilizan habitualmente para controlar la estabilidad conformacional de las proteínas. El uso de tensioactivos en este sentido es específico de la proteína, ya que cualquier tensioactivo determinado suele estabilizar algunas proteínas y desestabilizar otras.

35 Los polisorbatos son susceptibles a degradación oxidativa y a menudo, tal como son provistos, contienen cantidades suficientes de peróxidos que causan la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de proteínas, especialmente metionina. En consecuencia, los polisorbatos deben usarse cuidadosamente, y cuando se usan, se deben emplear en su concentración eficaz más baja. En este sentido, los polisorbatos ejemplifican la regla general de que los excipientes deben emplearse en sus concentraciones eficaces más bajas.

40 Las realizaciones de las formulaciones de proteínas de unión a antígenos CD27L comprenden además uno o más oxidantes. En algún grado, la oxidación perjudicial de las proteínas se puede prevenir en formulaciones farmacéuticas, manteniendo niveles correctos de oxígeno y temperatura ambiente, y evitando la exposición a la luz. Los excipientes antioxidantes también se pueden utilizar para prevenir la degradación oxidativa de las proteínas. Entre los antioxidantes útiles en este sentido se encuentran los agentes de reducción, los depuradores de oxígeno/radicales libres y los agentes quelantes. Los antioxidantes para uso en las formulaciones de proteínas terapéuticas de acuerdo con la invención preferiblemente son solubles en agua y mantienen su actividad durante toda la vida útil de un producto. EDTA es un antioxidante preferido de acuerdo con la invención en este sentido.

Los antioxidantes pueden dañar las proteínas. Por ejemplo, los agentes reductores, como el glutatión en particular, pueden romper los enlaces disulfuro intramoleculares. Por lo tanto, los antioxidantes para uso en la invención se seleccionan para, entre otras cosas, eliminar o reducir suficientemente la posibilidad de dañar por sí mismos las proteínas en la formulación.

- 5 Las formulaciones de acuerdo con la invención pueden incluir iones metálicos que son co-factores de proteínas y que son necesarios para formar complejos de coordinación de proteínas, como zinc necesario para formar ciertas suspensiones de insulina. Los iones metálicos pueden inhibir algunos procesos que degradan las proteínas. No obstante, los iones metálicos también catalizan los procesos físico-químicos que degradan las proteínas.

- 10 Los iones de magnesio (10-120 mM) se pueden usar para inhibir la isomerización de ácido aspártico a ácido isoaspártico. Los iones de Ca^{+2} (hasta 100 mM) pueden aumentar la estabilidad de la desoxirribonucleasa humana. Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , no obstante, pueden desestabilizar rhDNase. De modo similar, Ca^{+2} y Sr^{+2} pueden estabilizar el Factor VIII, que puede desestabilizarse por Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} , y su agregación puede ser aumentada por iones de Al^{+3} .

- 15 Las realizaciones de las formulaciones de proteínas de unión a antígenos CD27L comprenden además uno o más conservantes. Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales de múltiples dosis que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su función primaria es inhibir el crecimiento microbiano y asegurar la esterilidad del producto durante toda la vida útil o durante el término de uso del fármaco. Los conservantes comúnmente utilizados incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Si bien los conservantes tienen una larga trayectoria de uso con fármacos parenterales de moléculas pequeñas, el desarrollo de formulaciones de proteína que incluye conservantes puede ser problemático. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizante (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante en limitar su uso en formulaciones de proteínas de múltiples dosis. Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos de proteínas se han formulado para un solo uso. No obstante, cuando son posibles formulaciones de múltiples dosis, tienen la ventaja añadida de permitir la comodidad del paciente y de aumentar la capacidad de comercialización. Un buen ejemplo es aquel de la hormona del crecimiento humano (hGH) en donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha generado la comercialización de presentaciones en bolígrafo para inyección de múltiples usos, más convenientes. Por lo menos cuatro de dichos dispositivos de bolígrafos que contienen formulaciones conservadas de hGH están actualmente disponibles en el mercado. Norditropin (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ (líquido, Genentech) y Genotropin (cartucho de cámara dual liofilizado, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol, mientras que Somatrope (Eli Lilly) se formula con m-cresol.

- 25 30 Varios aspectos necesitan ser considerados durante la formulación y el desarrollo de formas de dosificación conservadas. La conservación eficaz en el producto de fármaco se puede optimizar. Esto requiere ensayar un conservante determinado en la forma de administración con intervalos de consideración que confieran efectividad antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína.

- 35 Como se podría esperar, el desarrollo de las formulaciones líquidas que contienen conservantes es más problemático que las formulaciones liofilizadas. Los productos liofilizados se pueden liofilizar sin el conservante y reconstituirse con un conservante que contiene diluyente al momento del uso. Esto reduce el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con las formulaciones líquidas, la efectividad y la estabilidad del conservante se deben mantener durante toda la vida útil del producto (aproximadamente 18 a 24 meses). Un punto importante por destacar es que la efectividad del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes excipientes.

- 40 45 Las formulaciones de proteínas de unión a antígenos CD27L en general se diseñarán para rutas y métodos específicos de administración, para dosis y frecuencias de administración específicas, para tratamientos específicos de enfermedades específicas, con intervalos de biodisponibilidad y persistencia, entre otras cosas. Las formulaciones se pueden diseñar por lo tanto de acuerdo con la invención para administración por cualquier ruta adecuada, entre ellas, oral, aural, oftálmica, rectal y vaginal, y por rutas parenterales, incluidas inyección intravenosa e intraarterial, inyección intramuscular e inyección subcutánea.

- 50 Una vez que la composición farmacéutica se ha formulado, se puede conservar en viales estériles como una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal o como polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones se pueden conservar o bien en forma lista para usar o en una forma (p. ej., liofilizada) que se reconstituya antes de la administración. La invención también da a conocer kits para producir una unidad de administración de una sola dosis. Los kits de la invención pueden contener cada uno un primer recipiente que tenga una proteína seca y un segundo recipiente que tenga una formulación acuosa. En determinadas realizaciones de esta aplicación, se proveen kits que contienen jeringas pre-rellenadas de una sola y de múltiples cámaras (p. ej., jeringas líquidas y liojeringas).

- 55 La cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene proteína de unión al antígeno CD27L que se ha de emplear dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. El experto en la técnica apreciará que los niveles de administración adecuados para tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la cual se esté usando la proteína de unión al antígeno CD27L, la ruta de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o el estado (edad y salud general) del paciente. En determinadas realizaciones, el médico puede titular la dosis y modificar la ruta de

administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 µg/kg y hasta aproximadamente 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. En realizaciones específicas, la dosis puede oscilar entre 1,0 µg/kg up y aproximadamente 20 mg/kg, opcionalmente entre 10 µg/kg up y aproximadamente 10 mg/kg o entre 100 µg/kg y aproximadamente 5 mg/kg.

- 5 Una cantidad terapéutica eficaz de una proteína de unión al antígeno CD27L preferiblemente resulta en una reducción de la intensidad de los síntomas de enfermedad, en un incremento de la frecuencia o duración de los períodos asintomáticos de la enfermedad o en una prevención del deterioro o discapacidad debida al padecimiento de la enfermedad. Para tratar tumores que expresan CD27L, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión al antígeno CD27L, p. ej., anti-CD27L ADC, preferiblemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento del tumor por al menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80% o por lo menos aproximadamente 90% en relación con pacientes no tratados. La capacidad de un compuesto de inhibir el crecimiento de un tumor se puede evaluar en un modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos.

- 15 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar usando un dispositivo médico. Los ejemplos de dispositivos médicos para administrar composiciones farmacéuticas se describen en las patentes de EE. UU. núm. 4.475.196; 4.439.196; 4.447.224; 4.447. 233; 4.486.194; 4.487.603; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 5.064.413; 5.312.335; 5.312.335; 5.383.851; y 5.399.163.

Métodos para diagnosticar o tratar una enfermedad o trastorno asociado con CD27L

- 20 Las proteínas de unión al antígeno CD27L de la invención son particularmente útiles para detectar CD27L en una muestra biológica. En determinadas realizaciones, una muestra biológica de un paciente se pone en contacto con una proteína de unión al antígeno CD27L. La unión de la proteína de unión al antígeno CD27L con CD27L se detecta luego para determinar la presencia o cantidad relativa de CD27L en la muestra. Dichos métodos pueden ser útiles para diagnosticar o determinar pacientes que son susceptibles al tratamiento con una proteína de unión al antígeno CD27L, p. ej., anti-CD27L ADC.

- 25 En ciertas descripciones, una proteína de unión al antígeno CD27L de la invención o descrita en este documento se usa para diagnosticar, detectar o tratar un trastorno autoinmune o inflamatorio. En el tratamiento de trastornos autoinmunes o inflamatorios, la proteína de unión al antígeno CD27L puede dirigir las células que expresan CD27L del sistema inmune para destrucción y/o puede bloquear la interacción de CD27L con el receptor CD27.

- 30 Se cree que la interacción de CD27L con CD27 cumple una función en las enfermedades autoinmunes mediadas por las células, como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Nakajima et al. (2000) J. Neuroimmunol. 109:188-96). Se cree que este efecto es mediado en parte por una inhibición de la producción de TNF-α. Asimismo, el bloqueo de la señalización de CD27L inhibe la expansión clonal mediada por CD40 de células CD8+ T y reduce la generación de células T de memoria CD8+ (Taraban et al. (2004) J. Immunol. 173:6542-6). Como tales, las proteínas de unión al antígeno CD27L se pueden emplear para tratar a un sujeto con un trastorno autoinmune, p. ej., un trastorno caracterizado por la presencia de células B que expresan CD27L incluidos, por ejemplo, encefalomiелitis autoinmune experimental. Los trastornos autoinmunes adicionales en los que los anticuerpos de esta invención se pueden usar incluyen, entre otros, lupus eritematoso sistémico (SLE), diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (incluidas enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y celiaquía), esclerosis múltiple (MS), psoriasis, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoidea (RA) y glomerulonefritis. Además, las composiciones de proteínas de unión a antígenos CD27L de la presente invención se pueden emplear para inhibir o prevenir el rechazo de trasplantes o en el tratamiento de la enfermedad injerto contra hospedante (GVHD).

- 45 A su vez, también se ha propuesto que la interacción de CD27L con CD27 cumple una función en la señalización en células CD4+ T. Algunos virus han demostrado señalar la vía de CD27, lo que produce la destrucción de respuestas de anticuerpos neutralizantes (Matter et al. (2006) J Exp Med 203:2145-55). Como tales, las composiciones de proteínas de unión a antígenos CD27L y los métodos de la presente invención se pueden utilizar para tratar a un sujeto con una infección vírica, entre ellas, infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis (A, B y C), virus del herpes, (p. ej., VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II y CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus gripal, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus de Coxsackie, coronavirus, virus sincicial respiratorio, virus de la paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de rubéola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, papilomavirus, virus del molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de encefalitis arboviral y virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV), o en el tratamiento de infección por VIH/sida. Asimismo, los anticuerpos humanos, composiciones y métodos de anticuerpos de la presente invención se pueden usar para inhibir la producción de TNF-α.

En determinadas realizaciones, la invención da a conocer una proteína de unión al antígeno CD27L de la invención para uso en un método de tratamiento del cáncer o de un trastorno tumorigénico.

- 55 En ciertas realizaciones, una proteína de unión al antígeno CD27L de la invención o descrita en este documento se utiliza para diagnosticar o detectar cáncer o un trastorno tumorigénico. Los tumores y tipos de cáncer susceptibles al tratamiento de la presente invención, en donde las células del tumor o del cáncer pueden expresar CD27L, incluyen, aunque sin limitarse a ello: carcinomas de células renales (RCC), como RCC de células claras, RCC papilar, RCC

5 cromóforo y similares, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello (p. ej., carcinomas de células escamosas (HNSCC), y similares), cáncer de mama, tumores cerebrales, carcinomas nasofaríngeos, linfoma no Hodgkin (NHL), como NHL de grado bajo, NHL de células grandes difusas, y similares, leucemia linfocítica aguda (ALL), como pre-B-ALL, y similares, leucemia linfocítica crónica (CLL o B-CLL), linfoma de Burkitt, linfomas de células grandes anaplásicas (ALCL),
 10 mieloma múltiple, linfomas de células T cutáneas, linfomas de células escindidas pequeñas nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas de células T periféricas, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfoma de células T (ATLL), leucemia de células T adultas (T-ALL), linfomas foliculares entroblasticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas de células grandes difusas de linaje B, linfoma de células T de tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfomas basados en la cavidad corporal asociados con VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas no diferenciados de rino-faringe (p. ej., tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y otros linfomas de células B. Tipos de tumores adicionales susceptibles al tratamiento de la presente invención incluyen los tumores de: riñón, páncreas, laringe o faringe, melanoma, ovario, adenocarcinoma de pulmón, colon, mama, cerebro y similares.

Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos, tanto reales como proféticos, se exponen para fines de ilustración de las realizaciones específicas o características de la presente invención y no tienen como propósito limitar su alcance.

Ejemplo 1 – Anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra CD27L

20 La generación de anticuerpos totalmente humanos dirigidos contra CD27L humano se llevó a cabo usando tecnología XENOMOUSE® (patentes de Estados Unidos núm. 6.114.598; 6.162.963; 6.833.268; 7.049.426; 7.064.244; Green et al., 1994, Nature Genetics 7:13-21; Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156; Green y Jakobovitis, 1998, J. Ex. Med. 188:483-495).

25 Ratones IgG1, IgG2 e IgG4 XENOMOUSE® fueron inmunizados/recibieron una dosis de refuerzo con CD27L soluble humano o CD27L humano expresado en forma recombinante en la superficie de células de ovario de hámster chino (CHO). Se produjeron hibridomas a partir de los ratones inmunizados. Se ensayó la unión de los sobrenadantes de los hibridomas a células 293 que expresan CD27L recombinante humano. Se obtuvo una unión positiva en más de 260 sobrenadantes.

Los sobrenadantes positivos se ensayaron luego para unión a CD27L nativo en la superficie de células Raji y/o 786-0. El ensayo de unión de CD27L nativo reveló 161 sobrenadantes positivos.

30 Esos sobrenadantes fueron ensayados para reactividad cruzada con CD27L de cynomolgus. Veinticinco sobrenadantes fueron positivos para reactividad cruzada con CD27L de monos cynomolgus. Esos veinticinco fueron luego ensayados para actividad de CDC y para capacidad de bloquear la unión de CD27 humano a CD27L humano. Diecinueve sobrenadantes fueron positivos para actividad de CDC y para inhibición de unión de CD27 a CD27L. La sub-clonación y secuenciación de 13 líneas de IgG1 y 6 líneas de IgG4 reveló 7 anticuerpos IgG1 únicos (Ab1-Ab7) y 1 anticuerpo IgG4 único (Ab8).

35 En la FIG. 1 se expone un resumen de las características de los ocho anticuerpos junto con aquellos de una versión quimérica de un CD27L antihumano de ratón comercialmente disponible.

Afinidad

40 La afinidad para CD27L humano soluble recombinante se determinó usando un chip CM5 en BIACORE 3000. Se usó anticuerpo IgG antihumano de cabra para capturar el anticuerpo de ensayo. Se midieron la unión y la disociación de CD27L soluble humano marcado con Histidina para determinar K_a , K_d y K_D . Las condiciones fueron las siguientes:

Temperatura = 25°C

Caudal = 50 ul/min

Tampón de corrida = HBS-EP

Regeneraciones con glicina 10mM pH 1,5

45 Intervalo de concentración de Hu CD27L-his fue 200 nM → 0,217 nM

Ajuste del modelo (Scrubber2): 1:1 unión + local $R_{máx}$.

Asociación de 5 minutos y disociación de 25 minutos

Actividad de ADCC

50 El ensayo de ADCC se llevó a cabo en una placa de cultivo de tejido estéril con fondo redondo de 96 pocillos (Corning). Los anticuerpos se titularon de 20 µg/ml a 0,0002 µg/ml transportando 10 µl en 100 µl de RPMI completo que contenía

5 10% FCS (dilución 1:10). Se añadieron dianas etiquetadas con calceína, 50 µl para contener 10.000 células. Las células diana y varias concentraciones de anticuerpo se incubaron durante 40 minutos a 4° C, luego se añadieron células efectoras NK, 50 µl para contener 200.000 células. Los cultivos se incubaron durante 4 horas a 37° C, luego los sobrenadantes se extrajeron y ensayaron para liberación de calceína midiendo la fluorescencia a 485-535 nm en un contador Wallac Victor II 1420 Multitable HTS. Se determinaron valores de lisis del 100% lisando seis dianas Raji etiquetadas en pocillos de calceína con detergente Igepal 630 (3 µl por pocillo), y se determinaron los valores de lisis espontánea midiendo la fluorescencia en los sobrenadantes de las dianas solas.

10 Se definió el porcentaje (%) de lisis específica como (fluorescencia de la muestra) - (fluorescencia de lisis espontánea)/(100% lisis – fluorescencia de lisis espontánea). Se ingresaron los datos brutos en una planilla de cálculo Excel con las fórmulas incorporadas para calcular el % de lisis específica y los valores resultantes se transfirieron a un programa gráfico (GraphPad Prism) en donde los datos se transformaron en un gráfico de ajuste de curvas sigmoidales. Los análisis subsiguientes (cálculos de regresión lineal) se efectuaron en GraphPad para generar valores de CE₅₀.

Actividad de ADCP

15 Se seleccionaron monocitos negativos de sangre periférica humana y se conservaron en una sala enfriada a 4°C durante la noche con medio RPMI 1640 que contenía 10% FBS. Luego los monocitos se sembraron en una placa de cultivo de tejido de 48 pocillos a 200.000 células por pocillo con 200 µl de medio de crecimiento (RPMI 1640 que contenía 10% FBS y 40 ng/ml Hu M-CSF) y se incubó a 37°C, 5% CO₂ durante 6 días para permitir que los monocitos se diferenciaron de los macrófagos.

20 El día 6, se efectuó el ensayo de ADCP de la siguiente manera:

1. Etiquetado de células diana con tinte verde PKH67 a concentraciones finales de 2×10^{-6} M tinte PKH67

• Se recogieron células tumorales y se lavaron una vez con PBS por centrifugación de las células (400 'g) durante 5 minutos.

25 • Después de centrifugar las células, se aspiró cuidadosamente el sobrenadante, pero dejando no más de 25 ml de sobrenadante.

• Cuatro µl de la disolución de tinte etanólico PKH67 a una concentración de stock de 4×10^{-6} M se añadieron a 1 ml de Diluyente C del kit en un tubo de polipropileno y se mezcló bien.

• Se resuspendieron los sedimentos celulares en 1 ml de Diluyente C a una densidad de 20×10^6 en un tubo de polipropileno.

30 • Las células se transfirieron rápidamente a una disolución de trabajo de tinte con introducción suave con pipeta para asegurar la dispersión completa.

• La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 4 minutos mezclando periódicamente.

• Se añadieron 2 ml de FBS activado completo a las células para detener la tinción, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto para permitir la unión del exceso de tinte.

35 • Se añadieron 40 ml de RPMI que contenía 10 % FBS a las células y se lavó una vez centrifugando las células (400 'g) durante 10 minutos.

• Se suspendieron los sedimentos celulares con 40 ml de medio nuevamente y se transfirieron a un tubo nuevo.

• Las células se lavaron nuevamente tres veces con medio RPMI +10 % FBS y 1x con medio de crecimiento completo (RPMI 1640 que contenía 10 % FBS y 40 ng/ml Hu M-CSF).

40 • Las células se contaron y suspendieron con medio de crecimiento a 1×10^6 células por ml para T:E en una relación 1:2.

2. Tratamiento de células tumorales con anticuerpos para fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP)

• Se prepararon diluciones de anticuerpos en medio de crecimiento de macrófagos. Estas diluciones se concentraron a concentraciones cuatro veces mayores.

45 • Para pre-incubar las células diana etiquetadas con verde PKH67 con anticuerpos, se mezclaron 280 ul de 4x anticuerpos concentrados con 280 ul de células tumorales etiquetadas con verde y se incubaron a 4°C durante 30 minutos.

- La mezcla de células tumorales etiquetadas con verde con los anticuerpos antitumorales se añadió a las células de macrófagos en una placa de 48 pocillos a 200 µl por cada pocillo según lo indicado en la tabla de Diseño experimental a continuación. El volumen final es 0,4 ml por pocillo. La relación de células diana a células efectoras (macrófagos) es 1:2.

5 • Las células se incubaron a 37°C, 5 % CO₂ durante una hora.

3. Contraintinción de macrófagos con marcador de macrófagos

- Se desprendieron células diana y macrófagos en una placa de 48 pocillos con mezcla de Trypsin-Versene.

10 • Las células se transfirieron a un bloque de 96 pocillos con 2,2-ml volumen por pocillo y se lavaron una vez con disolución de lavado FASC pre-calentada, girando los bloques a 400 'g durante 5 minutos y luego desechando el sobrenadante.

- Se tiñeron los macrófagos con su marcador, CD11b-Biotina en una dilución 1:200 en disolución de bloque con 100 µl por pocillo durante 10 min en hielo.

- Después de lavar las células una vez, los macrófagos se detectaron con estreptavidina Alexa 568 en diluciones 1:1000 durante 10 minutos en hielo.

15 • Después de lavar las células 1x con PBS, las células se fijaron con 4 % formaldehído-PBS a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego las células se lavaron 1x con dH₂O.

- Se resuspendieron los sedimentos celulares con agua a 200 µl por pocillo y se transfirieron a una placa de 96 pocillos a 100 µl por pocillo.

20 4. Medición cuantitativa de actividad de fagocitosis en una lectora ArrayScan V^{TI} HCS (versión 6, Cellomics Inc. Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) con BioApplication "Target Activation" empleando un objetivo 20x. La configuración del filtro se indica en la Tabla 2. Se contaron por lo menos 200 células en cada pocillo.

Tabla 2

Canal	Diana	Etiqueta	Fluor.
1	macrófagos	Ms-anti-Hu CD11b Biotina→estreptavidina Alexa 568	rojo
2	células tumorales	PHK67	verde

25 El análisis estadístico se efectuó usando Prism 4.01 (GraphPad, San Diego, CA). Un gráfico muestra el % de fagocitosis de las células tumorales frente al logaritmo de concentración de anticuerpos en ng/ml. El porcentaje de fagocitosis de las células tumorales se representa con el porcentaje de células tumorales que se superpusieron con macrófagos frente a los macrófagos totales en los campos seleccionados y obtenidos de la función de salida de la lectora ArrayScan "%RecuentoObjetos". Los % de valores se expresan como el error estándar de la media +/- (SEM) para mediciones por duplicado (n = 2). La CE₅₀ se determinó usando regresión no lineal (ajuste de curvas) seguida de ecuación de dosis y respuesta sigmoidal. Los datos se normalizaron a la señal máxima y mínima y se ajustaron a una curva de dosis y respuesta sigmoidal.

Actividad de CDC

35 Preparación de células tumorales: Se lavaron células Raji una vez con medio de ensayo y se resuspendieron en medio de ensayo (RPMI 1640 más 1% FBS). Las células se sembraron en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos a 50 µl por pocillo con dos densidades celulares para complementos de conejo y humano. Para los complementos de conejo, la densidad celular fue 5x10⁴ células por pocillo. Para complemento humano, la densidad celular fue 2x10⁵ células por pocillo.

40 Tratamiento de células con complemento y anticuerpo de ensayo: Se prepararon complementos concentrados tres veces en el medio de ensayo señalado en la Tabla 3. Luego se añadieron a células en placas a 50 µl por pocillo. Para las células tratadas con complemento de conejo, la concentración final de complemento de conejo fue 10%; para células tratadas con complemento humano, la concentración final de complemento humano fue 20%.

3x Complemento	Complemento (ml)	Medio de ensayo (ml)	Volumen total (ml)
30% HI conejo C' (inactivo)	0,5	1,16	1,66
30% sin HI conejo C' (activo)	2,5	5,83	8,33
60% HI Hu C' (inactivo)	0,5	0,33	0,83
60% sin HI Hu C' (activo)	3	2,0	5,0

Se añadieron los anticuerpos de ensayo a 10 µg/ml a células a 50 µl por pocillo. El volumen total en cada pocillo al inicio del cultivo fue 150 µl. Las células se incubaron continuamente a 37°C, 5% CO₂ por una hora para células tratadas con complemento de conejo y 6 horas para células tratadas con complemento humano.

- 5 Medición de citotoxicidad con la lectora de placas ArrayScan: Después de la incubación, se eliminaron 50 µl de medio de cada pocillo. El cóctel de Hoechst 33342 y yoduro de propidio (PI), que se preparó en una dilución 1:1000 en disolución de PBS que contenía 2% FBS, se añadió a las células a 100 µl por pocillo. Las células tratadas con complemento humano se transfirieron a una placa nueva de 96 pocillos a 40 µl por pocillo después de mezclar suavemente. Las muestras se analizaron en una lectora ArrayScan V^{TI} HCS (versión 6, Cellomics, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) con BioApplication "Target Activation" empleando un objetivo de 20x. La configuración del filtro se indica en la Tabla 4. Se contaron por lo menos 200 células en cada pocillo.

Tabla 4

Canal	Diana	Etiqueta	Fluor.	Filtro
1	Ácido nucleico para todas las células	Hoechst 33342	UV/460 nm	DAPI
2	Ácido nucleico para células muertas	Yoduro de propidio	488/>575 nm	TRITC

Análisis estadístico: El análisis estadístico se realizó usando Prism 4.01 (GraphPad, San Diego, CA).

15 Tiempo de internalización

Siembra de las células: Se sembraron células 786-0 en una placa de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo con 100 µl de medio de crecimiento (RPMI que contenía 10 % FBS) y se incubaron a 37°C, 5 % CO₂ durante 2 días para llegar al 100 % de confluencia celular el día del ensayo. Las células dispuestas en las placas se evaluaron para 1) internalización y 2) co-localización endosomal.

- 20 Tinción de células para tiempo-curso de internalización: La placa se lavó 1x con medio de ensayo (PBS que contenía 2 % FBS). Se añadieron anticuerpos a los pocillos a 2 µg/ml por pocillo (100 µl por pocillo) en medio de ensayo. Se dejó que los anticuerpos humanos se unieran a las células a 4°C durante 30 minutos y luego se lavó 1x con medio de ensayo. Se añadieron IgG Fab' Alexa 488 antihumano (1:100) y Hoechst 33342 (1:2000) a las células en medio de ensayo a 4°C durante 20 minutos. Luego las células se lavaron 1x con medio de ensayo. Las células o bien se fijaron y permeabilizaron, comenzando con tiempo cero, o se incubaron a 37°C, 5 % CO₂ por 1, 3 o 5 horas. Después de la incubación, las células se fijaron y permeabilizaron con el siguiente procedimiento. Las células se lavaron 1x con tampón de lavado BD, seguido de adición de disolución Fix/perm a los pocillos a 100 µl por pocillo. Las muestras se analizaron en una lectora ArrayScan V^{TI} HCS (versión 6, Cellomics, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) con BioApplication "Spot Detector" empleando un objetivo de 40x. La configuración del filtro para internalización se indica en la Tabla 5. Se contaron por lo menos 400 células en cada pocillo.

Tabla 5

Canal	Diana	Etiqueta	Filtro
1	Ácido nucleico para todas las células	Hoechst 33342	DAPI (azul)
2	Puntos internalizados	Alexa 488	FITC (verde)

5 Contratación de células para co-localización de puntos internalizados al compartimiento endosomal temprano: Después del análisis de internalización, se lavaron 786-0 células 1x con tampón BD. Las células se exploraron a disolución Fix/perm a TA durante 20 minutos. Después de 2x etapas de lavado, las células se incubaron con EEA-1 en tampón BD a 0,5 µg/ml (100 µl/pocillo) a TA durante 20 minutos. Las células se lavaron 1x con tampón BD y se añadieron con dilución anti-ratón Alexa 568 en una dilución 1:1000. Las células se incubaron a TA durante 20 minutos seguido de dos etapas de lavado de disolución tampón BD.

10 Obtención de imágenes fotográficas: Las imágenes celulares para internalización y co-localización se tomaron con un microscopio fluorescente Leica conectado a una cámara digital Hamamatsu con el software Openlab Image Analysis (Improvision Inc, Lexington, MA) o la lectora ArrayScan V^{TI} HCS.

15 Análisis estadístico: El análisis estadístico se realizó usando Prism 4.01 (GraphPad, San Diego, CA). Los recuentos de los puntos se expresaron como el error estándar de la media ± (SEM) para mediciones por duplicado (n = 2). Usando la herramienta de análisis, el recuento de puntos por unidad de tiempo (tasa de internalización) se ajustó a una ecuación de asociación exponencial de una fase.

Ejemplo 2 – Evaluación de anticuerpos conjugados a MCC-DM1

20 Ab1, Ab2, Ab4, Ab7,y Ab8 se conjugaron a MCC-DM1 (véase la Figura 12). El nivel de carga dirigido fue 4,5-5 fármacos por anticuerpo. En síntesis, las lisinas del anticuerpo se conjugaron al NHS-éster del reticulador hetero-bifuncional Succinimidil 4-[N-maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) que contiene un NHS-éster y una maleimida. Luego el anticuerpo modificado con enlazador se purificó a partir de exceso de enlazador y después se conjugó a la carga útil DM1 mediante un sulfhidrilo presente en DM1. El exceso de DM1 se eliminó luego en una segunda etapa de purificación para generar el conjugado final Ab-MCC-DM1.

25 Más particularmente, el anticuerpo CD27L, transitoriamente expresado en cultivo de células mamíferas 2936-E, se cargó a una columna MabSelect SuRe (GE Healthcare) que había sido equilibrada en Tris 25mM, cloruro de sodio 150mM, pH 7,4. La columna con anticuerpo CD27L unido se lavó luego con 3 etapas de lavado: primero un lavado de tampón de equilibrio, seguido de lavado con Tris 25mM, L-Arginina 500mM, pH 7,5 y un lavado final con tampón de equilibrio. El anticuerpo CD27L se eluyó con acetato de sodio 100mM, pH 3,5. Las fracciones que contenían el anticuerpo se combinaron y ajustaron hasta un pH final de 5,0 con Tris 1M, pH 8,0. El anticuerpo se purificó posteriormente en una columna Fractogel® EMD SO3-(M) (EMD Chemicals Inc) equilibrada en acetato de sodio 30mM, pH 5,0. El anticuerpo unido se eluyó con un gradiente 8CV entre cloruro de sodio 0 y 0,8M en acetato de sodio 30mM, pH 5,0. Las fracciones que contenían el anticuerpo se combinaron y dializaron en Tampón de Conjugación (EDTA 2mM, Cloruro de sodio 50mM, Fosfato de potasio 50mM, pH 6,5).

35 El anticuerpo CD27L purificado se modificó con el enlazador reactivo de amina Succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (Thermo Scientific) para introducir grupos maleimida reactivos con tiol. El anticuerpo a una concentración de 55µM se trató con 20 equivalentes molares de SMCC en Tampón de Conjugación ajustado a 10% dimetilacetamida (v/v) en la mezcla de reacción final. Después de incubación durante 90 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se desaló con una columna de desalación HiPrep 26/10 Sephadex G-25 de resina fina (GE Healthcare) equilibrada en EDTA 2mM, cloruro de sodio 150mM, citrato de sodio 35mM, pH 5,0. Las fracciones que contenían el anticuerpo se combinaron y ensayaron para el grado de modificación con el enlazador usando el reactivo de Ellman (5,5'-ditio-bis-[2-ácido nitrobenzoico]) como se describe a continuación. Se halló que el anticuerpo se modificó con un promedio de 7,5 grupos maleimida por anticuerpo.

45 El reactivo de Ellman es escindido por tioles, produciendo un producto amarillo con una absorbancia a 412nm. Se usó un ensayo de Ellman de sustracción para determinar el número de grupos maleimida en el anticuerpo CD27L después de la reacción con SMCC. El anticuerpo CD27L modificado con SMCC o una muestra control de tampón sin anticuerpo se incubaron con una concentración equivalente de tioles, DTT 0,4mM D (ditiotretol). Cualquier maleimida presente en la muestra de anticuerpo reaccionaría con los tioles en DTT, imposibilitando otra reacción con el reactivo de Ellman. El reactivo de Ellman se añadió luego a ambas muestras y se efectuó una cuantificación colorimétrica a 412nm para determinar la concentración del reactivo de Ellman sometido a reacción. La reducción de la concentración de tioles en la muestra de anticuerpos que comparada con la muestra control es proporcional al número de maleimidias presentes en la muestra de anticuerpo. Este valor se usó para determinar el número de grupos maleimida enlazados por anticuerpo CD27L modificado.

El anticuerpo CD27L modificado con SMCC (7,5 grupos maleimida por anticuerpo) en una concentración entre 17 μ M - 27 μ M se trató con 1,7 equivalentes molares de DM1 (Immunogen) por grupo maleimida tamponado con EDTA 2mM, NaCl 150mM, citrato de sodio 35mM, pH 5,0 ajustado hasta 3% DMA (v/v) en la mezcla de reacción final. Las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante la noche por hasta 20 horas. La mezcla de reacción se cargó en una columna de filtración de gel Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con fosfato de sodio 20mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 6,5. Las fracciones se recogieron, y las fracciones que contenían el anticuerpo monomérico se combinaron y ensayaron. La relación molar de moléculas DM1 enlazadas por anticuerpo se determinó midiendo la absorbancia a 252 nm y 280 nm, y se descubrió que era 4,5 – 5,0 DM1 moléculas por anticuerpo.

Farmacología *in vitro*

Los conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) Ab4- y Ab8-MCC-DM1 demostraron unión a CD27L nativo comparable a sus contrapartidas no conjugadas según lo evaluado por citometría de flujo. La CE50 de la unión observada para Ab4 y Ab4-MCC-DM1 fue la misma, mientras que fue 4 veces inferior para Ab8-MCC-DM1 según lo comparado con Ab8 (Tabla 6). Se determinó una medición más precisa de la afinidad de unión hacia Ab4, Ab8 y sus contrapartidas conjugadas midiendo su capacidad de unión a CD27L humano nativo expresado en células Raji con el uso de tecnología Gyros. Los resultados demostraron que ambos conjugados exhibieron afinidades sub-nM hacia CD27L dentro del doble de aquellas observadas con Ab4 y Ab8 no conjugados (Tabla 6). Tanto Ab4 y Ab8 conjugados como no conjugados también exhiben afinidades de unión a CD27L-his soluble humano dentro del doble de cada uno según lo determinado por BIACORE.

Tabla 6. Comparación de unión de Ab4 y Ab8 a sus contrapartidas conjugadas MCC-DM1

Medición	Ab4	Ab4-MCC-DM1	Ab8	Ab8-MCC-DM1
Gyros K _D -CD27L nativo-Raji	0,014 nM	0,023 nM	0,078 nM	0,077 nM
FACS (CE ₅₀)-786-0	0,1 nM	0,1 nM	0,02 nM	0,08 nM

La internalización de Ab4-MCC-DM1, Ab8-MCC-DM1, Ab4 y Ab8 se evaluó en la línea ccRCC humana que expresa CD27L, 786-0. Las células 786-0 que expresan CD27L se expusieron a anticuerpo anti-CD27L humano Ab4 y Ab8 no conjugado, Ab4-MCC-DM1, Ab8-MCC-DM1, HuIgG1 control o α SA-MCC-DM1 y se permitió la unión a 4°C. La internalización de los artículos de ensayo se evaluó usando células IgG Fab' Alexa 488 anti-hu de cabra FluoroNanogold. Las células se fijaron y permeabilizaron en tiempos específicos después de la incubación con los artículos de ensayo (tiempo = 0, 1, 3 y 5 horas) y se obtuvieron imágenes usando una lectora ArrayScan VTI HCS. La co-localización de los artículos de ensayo internalizados a los endosomas se determinó utilizando un anticuerpo anti-EEA-1, un marcador endosomal. La internalización dependiente del tiempo de los anticuerpos, incluido Ab4-MCC-DM1, se observó mediante análisis de imágenes por microscopía de fluorescencia mediante la formación de pequeños puntos dentro del citoplasma celular a 37°C en comparación con la localización de la membrana celular en tiempo cero a 4°C. Ab4-MCC-DM1 se co-localizó con el marcador endosomal EEA-1 después de una incubación de 5 horas a 37°C, demostrando que Ab4-MCC-DM1 se internaliza en el compartimento subcelular endosomal de células 786-0. El nivel y la tasa de internalización estuvieron dentro de un intervalo similar para Ab4, Ab8 y sus contrapartidas conjugadas (Figura 2).

Tanto Ab4-MCC-DM1 como Ab8-MCC-DM1 demostraron inhibición del crecimiento *in vitro* potente y específica de células tumorales que expresan CD27L. En un ensayo anti-proliferación (inhibición del crecimiento del tumor), Ab4-MCC-DM1, Ab8-MCC-DM1 o Ab4 o Ab8 anti-CD27L no conjugados se incubaron con células diana H1650 CD27L negativas o 786-0 luciferasa que expresa CD27L en presencia/ausencia de Ab4 o Ab8 desnudo, respectivamente, o HuIgG1 control por 4 días. Ambas líneas celulares, 786-0 luciferasa y H1650, se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos con medio de crecimiento a 100 μ l con 500 células por pocillo para 786-0 luciferasa y 1000 células por pocillo para H1650. Todas las placas se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ por 4 horas. Después de 4 horas de incubación, los conjugados de Ab desnudo se añadieron a las células a 100 μ l por pocillo en varias titulaciones de dosis. El volumen total en cada pocillo al inicio del cultivo fue 200 μ l. Las células se incubaron continuamente a 37 °C, 5 % CO₂ durante 4 días antes de medir los niveles de ATP celular. Para evaluar la inhibición del crecimiento de las células, se midieron los niveles de ATP (como un parámetro del número de células) mediante luminiscencia usando el kit de ensayo CellTiter-Glo.

Tanto Ab4-MCC-DM1 como Ab8-MCC-DM1 inhibieron el crecimiento celular de células 786-0 que expresan CD27L con una concentración de 50 % inhibición (CI50) como se expone en la Tabla 7. La inhibición del crecimiento celular no se observó en células H1650 CD27L-negativas tras la exposición a Ab4-MCC-DM1 y Ab8-MCC-DM1. La adición de un exceso de anticuerpo anti-CD27L parental no conjugado pudo bloquear la inhibición del crecimiento mediada por Ab4-MCC-DM1, lo que confirma que la unión a CD27L por Ab4-MCC-DM1 fue necesaria para la actividad. El conjugado anti-CD27L parental no conjugado no inhibió el crecimiento de células 786-0 que expresan CD27L. El conjugado control, anti-estreptavidina-MCC-DM1 (α SA-MCC-DM1), no exhibió ninguna inhibición del crecimiento

celular en la línea CD27L-positiva ni CD27L-negativa. Los resultados indican que tanto Ab4-MCC-DM1 como Ab8-MCC-DM1 fueron inhibidores potentes del crecimiento de las células 786-0 en comparación con el conjugado control (Figura 3). Ab4-MCC-DM1 tuvo una tendencia a exhibir un ligero incremento de la potencia frente a Ab8-MCC-DM1 (Tabla 7).

5 Tabla 7. Potencia celular de conjugados anti CD27L-MCC-DM1

786-0- _{CI50}	Ab4-MCC-DM1	Ab8-MCC-DM1
Conc. del fármaco (nM)	0,34	0,54
Conc. del anticuerpo (nM)	0,07	0,11

10 Citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADC) mediada por Ab4-MCC-DM1 contra células Raji con potencia similar (CE50 = 0,006 µg/ml) y de la magnitud de aquella observada para el anticuerpo Ab4 anti-CD27L parental no conjugado (CE50 = 0,01 µg/ml). En síntesis, linfocitos citolíticos naturales (NK) aislados de PBMC que se obtuvo de donantes de sangre humana normal se incubaron con células diana de linfoma de células B humanas Raji etiquetadas con calceína (expresan CD27L) en presencia de Ab4-MCC-DM1 o anticuerpos control como se describió anteriormente. El porcentaje (%) de citotoxicidad específica se determinó midiendo la liberación de calceína de células diana que expresan CD27L lisadas en presencia de Ab4-MCC-DM1 en comparación con pocillos control. Los resultados se exponen en la Figura 8 que indica que Ab4-MCC-DM1 medió un nivel similar de ADCC a aquel del anticuerpo Ab4 (valores CE50 de 0,006 y 0,01 µg/ml, respectivamente). El control hulG1 no medió ninguna lisis mensurable de dianas que expresen CD27L. Tanto Ab4-MCC-DM1 como el anticuerpo Ab4 no conjugado son capaces de inducir la ADCC mediada por linfocitos citolíticos naturales de dianas específicas de CD27L en niveles similares. Se observaron resultados parecidos para Ab8-MCC-DM1 y el anticuerpo Ab8 no conjugado.

15 La actividad *in vitro* de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) de Ab4-MCC-DM1 o anticuerpo parental no conjugado Ab4 se midió contra células tumorales Raji y 786-0. Ab4-MCC-DM1 medió un nivel similar de lisis mediada por el complemento a aquella observada para el anticuerpo parental no conjugado Ab4. En síntesis, se diferenciaron macrófagos de monocitos aislados de sangre periférica humana obtenida de donantes de sangre humana normal. Los macrófagos se incubaron con líneas celulares que expresan CD27L etiquetado con verde PHK67, 786-0 y Raji como células dianas en presencia de anticuerpo anti CD27L no conjugado Ab4, HulG1, Ab4-MCC-DM1, o anticuerpos control (αSA-MCC-DM1), como se describió anteriormente. El porcentaje (%) de fagocitosis de células tumorales se determinó a partir del porcentaje de células tumorales que fueron envueltas por macrófagos frente a los macrófagos totales en los campos seleccionados. Los resultados se exponen en la Figura 9 e indican que Ab4-MCC-DM1 medió potencia de ADCP similar en líneas celulares que expresan CD27L, 786-0 y Raji. Los valores CE50 del Ab4 no conjugado estuvieron dentro de 10 veces aquellos observados para Ab4-MCC-DM 1 (véase la Tabla 8).

20 Tabla 8

	786-0	Raji
Abs	CE50 (pM)	CE50 (pM)
Ab4	0,008	0,008
Ab4-MCC-DM1	0,087	1,421

25 Dado que la curva de dilución se efectuó en intervalos de dilución 1:40, los valores CE50 observados para Ab4-MCC-DM1 y para Ab4 no conjugado son de potencia similar (dentro del margen del factor de dilución). Por consiguiente, tanto el anticuerpo Ab4-MCC-DM1 conjugado como el anticuerpo WT Ab4 no conjugado son capaces de inducir al macrófago humano a mediar ADCP de células que expresan CD27L en niveles similares. Se observaron resultados parecidos para Ab8-MCC-DM1 y el anticuerpo Ab8 no conjugado.

30 Se evaluó la actividad de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) *in vitro* de Ab4-MCC-DM1 empleando tanto el complemento humano como de conejo y células tumorales Raji que expresan CD27L. A 10 µg/ml, Ab4-MCC-DM1 medió un nivel similar de lisis mediada por el complemento a aquella observada para el anticuerpo parental no conjugado Ab4 (72 % lisis del complemento de conejo y 17 % lisis humana). En resumen, los complementos de conejo o humano activados se incubaron con células diana Raji que expresan CD27L en presencia de anticuerpos anti CD27L o anticuerpos control, como se describió anteriormente. La inactivación mediada por CDC se midió a partir del rasgo de salida de una lectora ArrayScan "% objetos seleccionados" para detectar el % de PI positivo frente a Hoechst para

"% citotoxicidad". Los resultados indican que Ab4-MCC-DM1 medió niveles similares de CDC a aquel del anticuerpo WT Ab4 cuando se incuban células Raji tumorales con 10 % complemento de crías de conejo o 20 % complemento humano. Los complementos de conejo y humano inactivados por calor no demostraron ninguna inactivación mediada por CDC contra Raji. Por lo tanto, tanto Ab4-MCC-DM1 como Ab4 no conjugado inducen un nivel similar de actividad de CDC contra células diana tumorales que expresan CD27L. Se observaron resultados parecidos para Ab8-MCC-DM1 y para el anticuerpo no conjugado Ab8.

Farmacología *in vivo*

Se implantaron células 786-0 ccRCC (786-0 S4) sometidas a pasaje *in vivo*, en ratones CB-17/ SCID hembra usando MATRIGEL reducido en factor de crecimiento para generar xenoinjertos de tumores para estudios de eficacia. Las células 786-0 S4 expresan un promedio de aproximadamente 180.000 CD27L sitios/célula. El tratamiento con Ab4-MCC-DM1 o Ab8-MCC-DM1 se inició cuando el tamaño del tumor alcanzó un promedio de aproximadamente 250 mm³. Los animales que portaban tumores se sometieron a una aleatorización por tamaño del tumor en grupos de diez animales cada uno y recibieron una sola dosis intravenosa. Se llevó a cabo un estudio de respuesta a la dosis ciego de Ab4-MCC-DM1 y Ab8-MCC-DM1 que empleó dosis en el intervalo de 7-64 ug DM1/kg (0,3-2,5 mg Ab/kg) en este modelo de tumor establecido. Se observó una regresión robusta de los tumores en las dosis baja de 7 ug DM1/kg, media de 25 ug DM1/kg y alta de 64 ug DM1/kg. En las dosis media y alta, se mantuvieron regresiones completas durante por lo menos 28 días después de una sola dosis (Figura 4). No se observó pérdida de peso corporal en ninguno de los grupos de administración durante el curso del estudio.

En otra demostración de eficacia *in vivo*, se implantaron células Caki-1 ccRCC que expresan un promedio de 59.000 CD27L sitios por célula (3 veces menos que las células 786-0) en ratones CB-17/SCID como se describió previamente. Cuando los xenoinjertos de Caki-1 alcanzaron un tamaño promedio de 250 mm³, los animales que portaban tumores se sometieron a una aleatorización según el tamaño del tumor en grupos de diez animales cada uno y una sola dosis intravenosa por semana durante 3 semanas (para imitar más de cerca un esquema de administración clínica semanal). Se llevó a cabo un estudio de respuesta a la dosis ciego de Ab4-MCC-DM1 y Ab8-MCC-DM1 que empleó dosis en el intervalo de 60-270 ug DM1/kg (2,4-11 mg Ab/kg) en este modelo de tumor establecido. La regresión de los tumores se observó inicialmente con la dosis media de 120 ug DM1/kg y alta de 270 ug DM1/kg, mientras que la inhibición del crecimiento del tumor se observó con la dosis baja de 60ug DM1/kg en comparación con el conjugado o el vehículo control. A medida que transcurrió el tiempo, la regresión del tumor en los dos grupos de dosis más altas comenzó a disminuir tras 7 días de recibir la última dosis (Figura 5).

Al igual que las células ccRCC, las células de linfoma B Raji expresan CD27L (aproximadamente 200.000 sitios / célula) e internalizan el conjugado de fármaco y anti-CD27L que resulta en la detención mitótica y la muerte celular *in vitro*. Se evaluó la eficacia de Ab4-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto de Raji subcutáneo. Cuando los xenoinjertos de Raji alcanzaron un tamaño promedio de 250 mm³, los animales que portaban los tumores se sometieron a una aleatorización según el tamaño del tumor en grupos de diez animales cada uno y con una dosis intravenosa q4 días x 2 y luego una vez por semana durante una semana más por un total de 3 dosis (para imitar más de cerca un esquema de administración clínica semanal). Se llevó a cabo un estudio de respuesta a la dosis ciego de Ab4-MCC-DM1 que utilizó dosis en el intervalo de 60-270 ug DM1/kg (2,4-11 mg Ab/kg) en este modelo de tumor establecido. Se observó inhibición del crecimiento del tumor en todos los niveles de dosis, con >90 % de inhibición del crecimiento del tumor en la dosis media de 120 ug DM1/kg y alta de 270 ug DM1/Kg durante el período de administración activo, con una respuesta antitumoral intermedia observada con la dosis baja de 60 ug DM1/kg en comparación con el conjugado control (Figura 6). Al final del período de medición del tumor, una ligera mayoría de animales en los grupos de dosis media y alta exhibieron regresión del tumor, lo que sugiere que la optimización de la dosis y los esquemas podría mejorar la respuesta.

La eficacia de los diferentes intervalos de administración del conjugado control α SA-MCC-DM1 o Ab4-MCC-DM1 se evaluó en el modelo de xenoinjerto de 786-0. Se implantaron ratones CB-17/SCID con células tumorales 786-0. El día 13, 50 animales fueron sometidos a una aleatorización en cohortes de 10 animales cada uno con un volumen del tumor promedio de 200 mm³. A cada cohorte se le administró una dosis intraperitoneal o bien del conjugado control α SA-MCC-DM1 o de Ab4-MCC-DM1. El volumen del tumor se representa como el promedio del grupo \pm error estándar de la media (SEM). La significación estadística de las diferencias observadas entre las curvas de crecimiento se evaluó entre los días 13 y 59 por análisis de covarianza de mediciones repetidas (RMANOVA) de los datos del volumen del tumor transformados por logaritmos con comparaciones múltiples de Dunnett. La significación se alcanza si $p < 0,05$. Se administraron tres niveles de dosis de Ab4-MCC-DM1 (1,0, 2,0 o 2,9 mg/kg de Ab4-MCC-DM1 en base al anticuerpo o 25, 50 o 75 μ g/kg en base a equivalentes de DM1, respectivamente). La dosis de 1,0 mg/kg se administró una vez por semana o una vez cada 2 semanas por 6 semanas, la dosis de 2,0 mg/kg se administró una vez cada 2 semanas por 6 semanas y la dosis de 2,9 mg/kg se administró una vez cada 3 semanas por 6 semanas. Los animales recibieron las dosis por vía intraperitoneal, comenzando el día 13 post inoculación de los tumores. Alrededor del día 59, el grupo tratado con α SA-MCC-DM1 fue sacrificado debido a los grandes volúmenes de los tumores. El día 59, el volumen del tumor promedio de los ratones tratados con cada esquema de administración de Ab4-MCC-DM1 recibido fue significativamente inferior que aquel del grupo del conjugado control α SA-MCC-DM1 ($p < 0,0001$) (Figura 7). Regresión del tumor durable mediada por Ab4-MCC-DM1 con cada esquema de administración. No se observó pérdida de peso en ninguno de los grupos de tratamiento Ab4-MCC-DM1.

Farmacocinética

5 Los conjugados de fármaco y anticuerpo Ab4 y Ab8 se evaluaron después de la administración intravenosa a ratones CB-17/SCID hembra que contenía xenoinjertos de 786-0 que expresan CD27L en el contexto de los estudios de eficacia y un estudio de PK terminal de seguimiento. Las exposiciones acumulativas y los valores de aclaramiento estuvieron dentro de 1,33 y 1,4 veces las moléculas Ab4-MCC-DM1 y Ab8-MCC-DM1, y la semivida de ambas ADC fue aproximadamente 12 días en ratones.

10 La estabilidad y los parámetros de PK de los conjugados de fármaco y anticuerpo Ab4-MCC-DM1 y Ab8-MCC-DM1 se caracterizaron *in vivo* después de una sola dosis intravenosa (IV) en ratones CB-17/SCID que portaban xenoinjertos de 786-0. Las exposiciones de los dos conjugados de fármaco y anticuerpo fueron altamente comparables, pero Ab4-MCC-DM1 demostró una relación de conjugación más estable de fármaco a anticuerpo durante el curso de tiempo de 96 horas del estudio, según lo determinado por afinidad-MS que la molécula de Ab8-MCC-DM1. Ab4-MCC-DM1 no exhibió una pérdida detectable de integridad del conjugado 30 min o 24 horas post-inyección, mientras que Ab8-MCC-DM1 exhibió cambios a los 30 minutos y reducciones importantes en todas las especies de conjugados 24 horas después de la inyección.

15 **Ejemplo 3 – Mapeo de parátomos**

20 Las modificaciones a Ab4 se ensayaron para unión a CD27L por ELISA. Se unió CD27L a placas Maxisorp a temperatura ambiente durante > 2 horas, agitando con 1ug/ml en 100 ul. Las placas luego se bloquearon con 250 ul de 10% leche en polvo desnatada en PBS + 0,05% Tween 20 durante 2 horas. Después de un lavado 4 x 300 ul PBS + 0,05% Tween 20 (PBST), las titulaciones de control parentales de Ab modificado y purificadas que oscilaban entre 0,045 y 100 ng/ml se aplicaron a placas y se incubaron durante 1 hora. Se aplicó un anticuerpo de detección dhuFc conjugado a peroxidasa de rábano picante (Jackson) diluido 1:7000 a las placas después de otro lavado PBST y se incubó durante 1 hora. Se efectuó un lavado final y el sustrato de TMB se incubó durante 10 minutos y se cesó con ácido fosfórico. Se tomó una lectura de OD a 450nm y se graficó frente a la concentración. Estas curvas se analizaron luego con un ajuste de curvas no lineal de tres parámetros, y los valores de CE₅₀ y la señal máx. calculada se compararon con el control purificado. La unión se determinó como similar al parental si la CE₅₀ estuvo dentro del doble y la señal máx fue mayor que 50 %. La unión se redujo si la CE₅₀ aumentó más de 2 veces y/o la señal máxima fue menor que 50 %. La unión se suprimió si no se pudo generar una curva o si la señal máx fue inferior a 5 %.

25 Tabla 8: Las combinaciones de las modificaciones de las cadenas ligeras y pesadas se enumeran con sus niveles de expresión en ug/ml (determinados por la cuantificación de la Proteína A ForteBio) junto con su efecto sobre la unión.

Combinaciones	Expresión	Unión
N31H-Y58N + N31S-I34M	30,3	Se reduce
N31H-Y58N + G33S-I34L	46,7	Se suprime
N31H-Y58N + D54E-G55S	9,91	Se suprime
N31H-Y58N + S103G-G104S	14,6	Se suprime
N31H-Y58N + HC parental	10,4	Se reduce
R24K-S26G + N31S-I34M	13,8	Similar
R24K-S26G + G33S-I34L	16,9	Se suprime
R24K-S26G + D54E-G55S	1,87	Se reduce
R24K-S26G + S103G-G104S	3,76	Se reduce
R24K-S26G + HC parental	3,43	Similar
L55I-Y58F + N31S-I34M	9,53	Se reduce
L55I-Y58F + G33S-I34L	11,6	Se suprime
L55I-Y58F + D54E-G55S	1,26	Se reduce
L55I-Y58F + S103G-G104S	2,61	Se reduce

ES 2 806 146 T3

Combinaciones	Expresión	Unión
L55I-Y58F + HC parental	2,72	Similar
Q95N-T96S + N31S-I34M	24,6	Similar
Q95N-T96S + G33S-I34L	32,7	Se suprime
Q95N-T96S + D54E-G55S	1,89	Se reduce
Q95N-T96S + S103G-G104S	4,99	Se suprime
Q95N-T96S + HC parental	5,85	Similar
LC parental + N31S-I34M	31,6	Se reduce
LC parental + G33S-I34L	51,2	Se suprime
LC parental + D54E-G55S	7,03	Se reduce
LC parental + S103G-G104S	10,7	Se suprime
LC parental + HC parental	9,25	Similar

Trece de las 24 combinaciones de modificaciones efectuadas a Ab4 retuvieron algún nivel de unión a CD27L. Las 9 que no se unieron a CD27L tuvieron por lo menos una de las siguientes modificaciones: modificaciones de las cadenas pesadas "G33S-I34L" y "S103G-G104S" o modificación de la cadena ligera "N31H-Y58N". Del 97 % de anticuerpos similares (2 modificaciones de aminoácidos), el 75 % (6 de 8) retuvo algún nivel de unión, mientras que el 56 % (7 de 16) del 94 % de anticuerpos similares (4 modificaciones de aminoácidos) retuvo algún nivel de unión, 2 de los cuales tuvieron unión similar al control parental purificado. Esto demuestra que un anticuerpo tan solo 94 % similar a Ab4 puede incluso unirse a CD27L.

5

Lista de secuencias

SEQ ID NO:1

Secuencia de aminoácidos CD27L humano

**MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLG
WDVAELQLNHTGPPQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKQQLRIHRDGIYMVH
IQVTLAICSSTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGD
TLCTNLGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP**

10

SEQ ID NO:2

Secuencia de aminoácidos del precursor de CD27 humano

**MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCQMCPEPGTFLVKD
CDQHRKAAQCDPCIPGVSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACR
NGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQ
TLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLSLCSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKY
RSNKGESPVPEAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP**

ES 2 806 146 T3

SEQ ID NO:3

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de Ab1

CAGATGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCCTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGATGGCTCCATCATCAGTGGTGTCTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCCTGGAGTGGATTGGATACATCTATTACAGTGGGAGCACCTCC
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGACTTACCATGTCAAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGGAGT
GGATACAGCTATGCCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
GCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCG
TGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACCAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGG

TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCACCGTCCGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:4

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de Ab2

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCAGTGTCTCTGGTGAATCATCATCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTTTACAGTGGGAGCACCGAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGCTTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCCGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGGAGT
GGATACAGCTATGCCCTCTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA
GCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCTTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGG
TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGA
CCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCACCGTCCGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:5

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de Ab4

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCATACTGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGA
GGATATAGTGGCTACGATTTCGGGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACC
TCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACG
GTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTTACAG
TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT
GAGCCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
GGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCT
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

SEQ ID NO:6

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de Ab5

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTG
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTACCAGTTATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCC
ACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATGAACCTAACAGTGGTAACACAGGCTAT
GCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGGGTAC

GATTTTTGGAGTGGTTATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC
 ACGGTACACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC
 TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
 GAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG
 GCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGCAGCGTCCCTCCAGC
 AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
 GACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCA
 CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCCAAGGACACCCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
 CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTGCACCAG
 GACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC
 ATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTG
 CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
 TTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTAC
 AAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAACCACTACACGCAGAAGACCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

SEQ ID NO:7

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de Ab6

CAGGTTCAAGTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
 CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTTACACACTAT
 GCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACTAC
 GGTGGTAACGACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAGGTACCGTCTCC
 TCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
 TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCC
 TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
 ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAG
 CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC
 CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC

TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO:8

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de Ab7

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT
GGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAAC
AGTCACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
GCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTG
TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTTACAGTCTCA
GGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
TACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
AAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGA
CCGTCACTCTCCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
GAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCAGGAGGAG
ATGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCCTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:9

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de Ab8

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTGATAAATACTTT
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGG
ATAGCAGGAGCTCGTACGTCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC
TCCTCAGCTAGCACAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACC
TCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
GTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAG
TCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT
GAGCCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCACCGTGCACCTGAACTCCTG
GGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
GGCAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAC
ATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCAGG
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCT
CCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:10

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Ab1

QMQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSIISGVYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTS
YNPSLKSRMTMSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYSYALFDYWGQGLVTVSS
ASTKGFSPVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALTSVHTFPAPVLQSS
GLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QOQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:11

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Ab2

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSIISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIFYSGSTD
YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSGYSYALFDHWGQGTTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCP
APELLEGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSREEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQOQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:12

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Ab4

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGIHWVRQAPGKLEWVAVIWYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSGYDSGFDYWGQGTTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCP
APELLEGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQOQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:13

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Ab5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGMNPNPNSGNTGY
AQKFQGRVTMTRNTSISITAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYDFWVSGYYYYYGMVDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCP
APELLEGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSREEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQOQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:14

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Ab6

QVQLVQSGAEVVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISA YNGYTHY
AQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYGGNDYYGMDVWGQGT TTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:15

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Ab7

QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWDGSKNY
GDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDNSHYYYGMDVWGQGT TTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:16

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Ab8

QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWDGSDKYF
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGIAGARYVYFDYWGQGT LVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:17

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab1

QMQLQESGPGLVKPSQTL~~SL~~TCTVSDGSIISGVYYWSWIRQH~~PG~~KGLEWIGYIYYSGSTS
YNPSLKSRLTMSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSGYSYALFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:18

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de Ab2

QVQLQESGPGLVKPSQTL~~SL~~TCTVSGDSIIISGGYYWSWIRQH~~PG~~KGLEWIGYIFYSGSTD
YNPSLKS~~RV~~TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSGYSYALFDHWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:19

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab3

EVQLLES~~GG~~LVQPGGSLRLS~~CA~~ASGFTFSSYAMSWVRQAP~~KG~~LEWVSVISDSGGT~~TD~~
5 ADSVKGRFTISRDN~~SK~~N~~TL~~YLQ~~M~~NSLRAEDTAVYYCARHDYSNRYYFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:20

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab4

QVQLVES~~GG~~VVQ~~PR~~SLRLS~~CA~~ASGFTFSNYGIHWVRQAP~~KG~~LEWVAVIWIYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDN~~SK~~N~~TL~~YLQ~~M~~NSLRAEDTAVYYCARDGGYSGYDSGFDYWGQGLTVTV
SS

SEQ ID NO:21

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV~~S~~CKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEW~~M~~GMNPN~~S~~NGNTGY
AQKFQGRVTMTRNTSIS~~T~~AYMELSSLRSED~~T~~AVYYCARGYDFW~~S~~GYYYYYYGM~~D~~VWGQGT
10 TVTVSS

SEQ ID NO:22

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV~~S~~CKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEW~~M~~GISAYNGYTHY
AQKLQGRVTMTTDTST~~S~~TAYMELRSLRSD~~D~~TAVYYCARDYGGNDY~~Y~~GM~~D~~VWGQGT~~T~~TVTVS
S

SEQ ID NO:23

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab7

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYY
GDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNSHYYYGMDVWGQGTTVTVSS**

SEQ ID NO:24

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab8

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSDKYF
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGIAGARYVYFDYWGQGTTLVTV
SS**

SEQ ID NO:25

5 Secuencia de aminoácidos CDR1 de la cadena pesada de Ab1

SGVYYWS

SEQ ID NO:26

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab2

SGGYYWS

10 **SEQ ID NO:27**

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab3

SYAMS

SEQ ID NO:28

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab4

15 **NYGIH**

SEQ ID NO:29

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab5

SYDIN

SEQ ID NO:30

20 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab6

SYGIS

SEQ ID NO:31

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab7

TYGMH

25 **SEQ ID NO:32**

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab8

SYGMH

SEQ ID NO:33

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab1

30 **YIYYSGSTSYNPSLKS**

SEQ ID NO:34

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab2

YIFYSGSTDYNPSLKS

SEQ ID NO:35

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab3

5 VISDSGGTTDYADSVKG

SEQ ID NO:36

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab4

VIWYDGSNKYYADSVKG

SEQ ID NO:37

10 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab5

WMNPNSGNTGYAQKFQG

SEQ ID NO:38

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab6

WISAYNGYTHYAQKLQG

15 SEQ ID NO:39

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab7

VIWYDGSNKYYGDSVKG

SEQ ID NO:40

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab8

20 VIWYDGS DKYFADSVKG

SEQ ID NO:41

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab1

SGYSYALFDY

SEQ ID NO:42

25 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab2

SGYSYALFDH

SEQ ID NO:43

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab3

HDYSNRYYFDY

30 SEQ ID NO:44

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab4

DGGYSGYDSGFDY

SEQ ID NO:45

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab5

35 GYDFWSGYYYYYYGMDV

SEQ ID NO:46

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab6

DYGGNDYYGMDV

SEQ ID NO:47

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab7

5 DNSHYYYGMDV

SEQ ID NO:48

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab8

DGIAGARYVYFDY

SEQ ID NO:49

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab1

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTTTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCGTTGACAGATATTTCAATTGGTATCAGCAGAAACCT
GGGAAAGCCCTAAGGTCTGATCTTTGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCCGGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGCTACAGTACCCCGTGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAGTCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCA
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

10

SEQ ID NO:50

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab2

GACATCCAGATGACCCAGTCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCAGTTGCCGGGCAAGTCAGTTCATTGGCAGATATTTCAATTGGTATCAGCAGCAACCA
GGGAAAGCCCTAAGGTCTGATCTATGCTGAATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA

AGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAAGATACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGTGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCA
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO:51

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab4

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
 ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGAATAGTAATGGATACAACCTATTTGGATTGG
 TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGTTCTGATCTATTTGGGTTCTTATCGGGCC
 TCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACTGAGAATC
 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGTATACAACCTTACAACCTCCA
 TTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTC
 TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG
 CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAA
 TCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
 AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO:52

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab5

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCTGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAAC
 CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAGA
 CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
 GACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGGAG
 CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCTGCAGTCTGGTAGCTCTGTCCCCTCACTTTC
 GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC
 CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC
 TTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA
 TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC

CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
 CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

5

SEQ ID NO:53

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab6

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATC
 TCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAATTAATTATGTATACTGGTACCAGCAGCTC
 CCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGGAGTGATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCT
 GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCCTCAGTGGGCTCCGG
 TCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTGTGGTG
 TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGCCAACCGAAAGCGGCGCCCTCGGTCACT
 CTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCCACTGGTGTGTCTCATA
 AGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAG
 GCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGC
 TATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCAGG
 CATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTTCATAG

SEQ ID NO:54

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab7

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCACCATC
TCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGAGGTTATGATGTAAATTGGTATCAGCAG
TTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATCTATGTTAACAACAATCGGCCCTCAGGAGTC
CCTGACCGATTCTCTGGCTCCACGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGACTC
CAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACACCAGCCTGAGTGCTTCG
GTATTCCGGCGGAGGGACCAGACTGACCGTCCTAGGCCAACCGAAAGCGGGCGCCCTCGGT
ACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTC
ATAAGTGACTIONTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTC
AAGGCGGGAGTGGAGACCACCACCCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGGGCCAGC
AGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTC
ACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:55

Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab8

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTGGGCGAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCA.
GGGAAAGCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAGGTGGGGTCCCATCA
AAGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTAAGTCCCAACAATATTATAATTACCCATPCACTTTCGGCCCT
GGGACCACAGTGGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
5 CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

SEQ ID NO:56

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab1

DIQMTQSPSSLSASLGDRVITICRASQSVDRYFNWYQQKPKAPKVLIFAASSLQSGVPS
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:57

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab2

DIQMTQSPSSLSASVGRVITISCRASQFIGRYFNWYQQQPKAPKVLIIYAESSLQSGVPS
RFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFARYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

SEQ ID NO:58

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab4

DIVMTQSP~~LSL~~PVTPGEPASISCRSSQSL~~LN~~SN~~GY~~NYLDWYLQKPGQSPQFLIYLGSYRA
SGV~~PDF~~RFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCIQTLQTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSV
FI~~FPP~~SDEQLKSGTASV~~VCL~~LNNFY~~P~~REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
SSTLTLSKADY~~E~~KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:59

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab5

EIVLTQSPG~~TLSL~~SPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLT~~ISS~~LEPEDFAVYYC~~LS~~QSGSSVPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI~~F~~
PPSDEQLKSGTASV~~VCL~~LNNFY~~P~~REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL~~S~~SST
LTLSKADY~~E~~KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEQ ID NO:60

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab6

QSVLTQPPSASGTPGQ~~RVTI~~SCSGSSSNIGIN~~VY~~WYQQLPGTAPKLLIYRSDQRPSGVP
DRFSGSKSGTSASLALSGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVF~~GGG~~TKLTVLGQPKAAPSVT
LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:61

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab7

QSVLTQPPSVSGAPGQ~~RVTI~~SCTGSSSNIGAGYD~~VN~~WYQ~~Q~~FPGTAPKLLIYVNNRPSGV
PDRFSGSTSGTSASLAI~~TGL~~QAEDEADYYCQSYD~~TS~~LSASV~~F~~GGGTR~~LT~~VLGQPKAAPSV
TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAAS
SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

10

SEQ ID NO:62

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab8

DIQMTQSPSSLSASV~~GDRVTI~~TCRASQGISNYLAWFQ~~Q~~KPGKAPKSLIYAASSLQGGVPS
KFSGSGSGTDFTLT~~ISS~~LQPEDFATYYCQ~~Q~~YNY~~P~~FTFGPGTTVDIKRTVAAPSVFI~~FPP~~
SDEQLKSGTASV~~VCL~~LNNFY~~P~~REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL~~S~~SSTLT
LSKADY~~E~~KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:63

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab1

DIQMTQSPSSLSASL~~GDRVTI~~TCRASQSV~~DRY~~FNWYQ~~Q~~KPGKAPKVLIFAASSLQSGVPS
RFGSGSGSGTDFTLT~~ISS~~LQPEDFATYYCQ~~Q~~SYSTPWTFGQGTKVEVK

SEQ ID NO:64

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab2

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTISCRASQFIGRYFNWYQQQPGKAPKVL IYAESSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFARYYCQQSYSTPWFPGGTKVEIK

SEQ ID NO:65

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab3

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSFSSNYLAWYQQKPGQAPRLFIYGASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYGISPCSFQGTKEIK

SEQ ID NO:66

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab4

DIVMTQSPPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQFLIYLGSYRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCIQTLQTPFTFGPGTKVDIK

5

SEQ ID NO:67

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab5

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCLQSGSSVPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO:68

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab6

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGINYVYWYQLPGTAPKLLIYRSDQRPSGVP
DRFSGSKSGTSASLALSLGRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTKLTVL

10

SEQ ID NO:69

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab7

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVNWYQQFPGTAPKLLIYVNNNRPSGV
PDRFSGSTSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDTSLSASVFGGGTRLTVL

SEQ ID NO:70

Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab8

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQGGVPS
KFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYYNYPFTFGPGTTVDIK

SEQ ID NO:71

15 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab1

RASQSVDRYFN

SEQ ID NO:72

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab2

RASQFIGRYFN

20 **SEQ ID NO:73**

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab3

RASQSFSSNYLA

SEQ ID NO:74

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab4

5 RSSQSLNSNGYNYLD

SEQ ID NO:75

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab5

RASQSVSSSYLA

SEQ ID NO:76

10 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab6

SGSSSNIGINYVY

SEQ ID NO:77

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab7

TGSSSNIGAGYDVN

15 SEQ ID NO:78

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab8

RASQGISNYLA

SEQ ID NO:79

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de Ab1

20 AASSLQS

SEQ ID NO:80

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de Ab2

AESSLQS

SEQ ID NO:81

25 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de Ab3

GASSRAT

SEQ ID NO:82

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de Ab4

LGSYRAS

30 SEQ ID NO:83

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de Ab5

GASSRAT

SEQ ID NO:84

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de Ab6

35 RSDQRPS

SEQ ID NO:85

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de Ab7

VNNNRPS

SEQ ID NO:86

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de Ab8

5 AASSLQG

SEQ ID NO:87

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab1

QSYSTPWT

SEQ ID NO:88

10 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab2

QSYSTPWT

SEQ ID NO:89

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab3

QYGISPCS

15 SEQ ID NO:90

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab4

IQLQTPFT

SEQ ID NO:91

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab5

20 LQSGSSVPLT

SEQ ID NO:92

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab6

AAWDDSLSGVV

SEQ ID NO:93

25 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab7

QSYDTLSASV

SEQ ID NO:94

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab8

QQYYNYPFT

30

Lista de secuencias

<110> DELANEY, John M.

FANSLOW III, William Christian

KING, Chadwick Terence

35 <120> PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO CD27L

<130> A-1437-US-NP

<140> XX/XXX,XXX

< 141> 2012-09-19

<150> 61/538.024

< 151> 2011-09-22

5 <160> 94

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 193

< 212> PRT

10 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Human CD27L

<400> 1

ES 2 806 146 T3

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
 1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile
 20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
 35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
 50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
 65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
 85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
 100 105 110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
 115 120 125

Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
 130 135 140

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
 145 150 155 160

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
 165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
 180 185 190

Pro

<210> 2

5 < 211> 217

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

10 < 223> Precursor de CD27 humano

<400> 2

ES 2 806 146 T3

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
 20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
 35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
 65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
 85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
 100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
 115 120 125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
 130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
 145 150 155 160

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

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
 180 185 190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
 195 200 205

Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr
 210 215

<210> 3

5 < 211> 1350

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

10 < 223> Secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas pesadas de Ab1

<400> 3

ES 2 806 146 T3

cagatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgatgg ctccatcatc agtgggtgtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt ggatacatct attacagtgg gagcacctcc 180
 tacaaccogt ccctcaagag togacttacc atgtcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccttgaagc tgagctctgt gactgcccg gacacggccg tgtattactg tgcgaggagt 300
 ggatacagct atgccctctt tgactactgg ggcagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360
 gctagcacca agggcccac cgtcttcccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg 420
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgog 480
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 660
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaact cctgggggga 720
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1020
 aaagccaaag gcagccccc agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
 ctggactccg acggtcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctcogtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 1320
 cagaagagcc tctccctgct tccgggtaaa 1350

<210> 4

5 < 211> 1350

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

10 < 223> Secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas pesadas de Ab2

<400> 4

ES 2 806 146 T3

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtga ctccatcatc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct tttacagtgg gagcaccgac 180
 tacaaccogt ccctcaagag tggagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tatattactg tgcgaggagt 300
 ggatacagct atgccctctt tgaccactgg ggcagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360
 gctagacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 660
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 720
 ccgtcagctt tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
 ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacia gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacia ccactacag 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 5

5 < 211> 1359

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

10 < 223> Secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas pesadas de Ab4

<400> 5

ES 2 806 146 T3

caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatggca tacactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggtcggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgga 300
 ggatatagtg gctacgattc ggggtttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctcagcta gcaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 420
 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660
 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 720
 gggggaccgt cagtcttctc cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1020
 atctccaaag ccaaggggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080
 gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt 1200
 cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1359

<210> 6

5 < 211> 1371

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

10 < 223> Secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas pesadas de Ab5

<400> 6

ES 2 806 146 T3

```

caggtgcagc tggcgagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc      120
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggctat      180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtac      300
gatttttggg gtggttatta ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc      360
acggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag ggcccatccg tcttccccct ggcaccctcc      420
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggccaagga ctacttcccc      480
gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg      540
gctgtcctac agtcctcagc actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc      600
agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg      660
gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca      720
cctgaaactc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc      780
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct      840
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg      900
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag      960
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc     1020
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagcccccag aaccacaggt gtacaccctg     1080
cccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc     1140
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac     1200
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctatag caagctcacc     1260
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct     1320
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaata a                    1371

```

<210> 7

5 < 211> 1356

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

10 < 223> Secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas pesadas de Ab6

<400> 7

ES 2 806 146 T3

caggttcagc tggcgagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatgggta cacacactat 180
 gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagactac 300
 ggtggtaaag actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagctagca ccaagggccc atccgtcttc ccctggcac cctcctcaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcagactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaaaccca aggtggacaa gagagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 780
 cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agcccgggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1080
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggta aaggcttcta tcccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aatga 1356

<210> 8

< 211> 1350

< 212> ADN

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 223> Secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas pesadas de Ab7

<400> 8

ES 2 806 146 T3

caggTgcagc tggTggagtc tgggggaggc gtggTccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt acctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagataac 300
 agtcaactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360
 gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg 420
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggTcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtggTgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 660
 aaatcttTgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccccag cacctgaact cctggggggga 720
 ccgtcagTct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 780
 gaggtcacat gcgtggTggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtggTcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggTcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
 ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 9

< 211> 1356

< 212> ADN

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 223> Secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas pesadas de Ab8

<400> 9

ES 2 806 146 T3

```

caggTgcagc tggTggagtc tgggggaggc gtggTccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggtctggagt ggtggcagtt atatggtatg atggaagtga taaatacttt      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatggg      300
atagcaggag ctgcgtacgt ctactttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc      360
tcctcagcta gcaccaaggg cccatccgtc tccccctgg caccctcctc caagagcacc      420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg      480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag      540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc      600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt      660
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg      720
gggggaccgt cagtcttctc cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg      780
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgaccacg aagaccctga ggtcaagttc      840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag      900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat      960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc     1020
atctccaag ccaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg     1080
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggett ctatcccagc     1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt     1200
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc     1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac     1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa                                1356

```

<210> 10

< 211> 450

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de Ab1

<400> 10

ES 2 806 146 T3

Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Gly Ser Ile Ile Ser Gly
 20 25 30

Val Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Ser Tyr Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

ES 2 806 146 T3

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 11

< 211> 450

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de Ab2

ES 2 806 146 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ile Ser Gly
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Ser Tyr Ala Leu Phe Asp His Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 <400> 11 225 230 235 240

ES 2 806 146 T3

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 12

< 211> 452

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de Ab4

10 <400> 12

ES 2 806 146 T3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Ser Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

ES 2 806 146 T3

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 13

< 211> 456

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de Ab5

ES 2 806 146 T3

<400> 13

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 210 215 220

ES 2 806 146 T3

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 14

< 211> 451

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

ES 2 806 146 T3

< 223> Secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de Ab6

<400> 14

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

ES 2 806 146 T3

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 15

< 211> 450

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

ES 2 806 146 T3

< 223> Secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de Ab7

<400> 15

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Asn Ser His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

ES 2 806 146 T3

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys

450

<210> 16

5 <211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 806 146 T3

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de Ab8

<400> 16

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ile Ala Gly Ala Arg Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

5

ES 2 806 146 T3

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 17

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 806 146 T3

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab1

<400> 17

Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Gly Ser Ile Ile Ser Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Ser Tyr Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

5 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

< 211> 120

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10 <220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab2

<400> 18

ES 2 806 146 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Asp Ser Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Asp Tyr Ser Asn Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

5 < 211> 122

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

10 < 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab4

<400> 20

ES 2 806 146 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Ser Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21

< 211> 126

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab3

<400> 21

ES 2 806 146 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 22

< 211> 121

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab6

<400> 22

ES 2 806 146 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23

5 < 211> 120

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

10 < 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab7

<400> 23

ES 2 806 146 T3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Asn Ser His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24

< 211> 122

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de Ab8

<400> 24

ES 2 806 146 T3

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ile Ala Gly Ala Arg Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25

< 211> 7

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab1

<400> 25

10 Ser Gly Val Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 26

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

15 <220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab2

<400> 26

20 Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 27

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab3
 5 <400> 27
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 28
 < 211> 5
 < 212> PRT
 10 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab4
 <400> 28
 Asn Tyr Gly Ile His
 15 1 5
 <210> 29
 < 211> 5
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 20 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> SYDIN
 <400> 29
 Ser Tyr Asp Ile Asn
 1 5
 25 <210> 30
 < 211> 5
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 30 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab6
 <400> 30
 Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5
 <210> 31
 35 < 211> 5

ES 2 806 146 T3

< 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 5 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab7
 <400> 31
Thr Tyr Gly Met His
1 5
 <210> 32
 < 211> 5
 10 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada de Ab8
 15 <400> 32
Ser Tyr Gly Met His
1 5
 <210> 33
 < 211> 16
 < 212> PRT
 20 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab1
 <400> 33
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 25 **1 5 10 15**
 <210> 34
 < 211> 16
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 30 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab2
 <400> 34
Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
 35 <210> 35

ES 2 806 146 T3

< 211> 17
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens
<220>
5 < 221> MISC_FEATURE
< 223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab3
<400> 35
Val Ile Ser Asp Ser Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly
<210> 36
10 < 211> 17
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens
<220>
< 221> MISC_FEATURE
15 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab4
<400> 36
Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly
<210> 37
< 211> 17
20 < 212> PRT
< 213> Homo sapiens
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab5
25 <400> 37
Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly
<210> 38
< 211> 17
< 212> PRT
30 < 213> Homo sapiens
<220>

ES 2 806 146 T3

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab6

<400> 38

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

5 <210> 39

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

10 < 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab7

<400> 39

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 40

15 < 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

20 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada de Ab8

<400> 40

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 41

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

30 < 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab1

<400> 41

ES 2 806 146 T3

Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 46

< 211> 12

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab6

<400> 46

10 Asp Tyr Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 47

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

15 <220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab7

<400> 47

20 Asp Asn Ser His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 48

< 211> 13

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

25 < 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada de Ab8

<400> 48

30 Asp Gly Ile Ala Gly Ala Arg Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 49

30 < 211> 642

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

ES 2 806 146 T3

< 223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab1

<400> 49

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctttaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcgttgac agatatttca attggtatca gcagaaacct      120
gggaaagccc ctaaggtcct gatccttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcggtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agctacagta ccccggtggac gttcggccaa      300
gggaccaagg tggaaagcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                          642

```

<210> 50

5 < 211> 642

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

10 < 223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab2

<400> 50

```

gacatccaga tgaccagtc cccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcagttgcc gggcaagtca gttcattggc agatatttca attggtatca gcagcaacca      120
gggaaagccc ctaaggtcct gatctatgct gaatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
agattcagtg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caagatacta ctgtcaacag agttacagta ccccggtggac gttcggccaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                          642

```

15 <210> 51

< 211> 66

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

ES 2 806 146 T3

<220>

< 221> misc_feature

< 223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab4

<400> 51

	gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc	60
	atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg aatagtaatg gatacaacta tttggattgg	120
	tacctgcaga agccagggca gtctccacag ttctgatctt atttgggttc ttatcgggcc	180
	tccggggctc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgagaatc	240
	agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgta tacaactctt acaaactcca	300
	ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc	360
	ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
	ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa	480
	tgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
	agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa	600
5	gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag	660

<210> 52

< 211> 651

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

10 <220>

< 221> misc_feature

< 223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab5

<400> 52

	gaaattgtgt tgacgcagtc tcttggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaga	120
	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcacca gcagggccac tggcatccca	180
	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagtctggag	240
	cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtctg cagtctggta gctctgtccc gctcactttc	300
	ggcggagggg ccaaggtgga gatcaaacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc	360
	ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	420
	ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac	480
	tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	540
	ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	600
	cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta a	651

15 <210> 53

< 211> 651

< 212> ADN

ES 2 806 146 T3

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab6

5 <400> 53

```

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc      60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcggg attaattatg tatactggta ccagcagctc      120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggagtgatc agcggccctc aggggtccct      180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccctcag tgggctccgg      240
tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgag tgggtgtggtg      300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggccaaccga aagcggcgcc ctcggtcact      360
ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccaaacaagg ccacactggt gtgtctcata      420
agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag      480
gctgggagtg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc      540
tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg      600
catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttcata g                651

```

<210> 54

< 211> 651

< 212> ADN

10 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab7

<400> 54

```

cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtaaattg gtatcagcag      120
ttcccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatgttaaca acaatcggcc ctcaggagtc      180
octgaccgat tctctggctc cacgtctggc acctcagcct ccctggccat cactggactc      240
caggctgagg atgaggctga ttattaactgc cagtcctatg acaccagcct gagtgettctg      300
gtattcggcg gagggaccag actgaccgtc ctaggccaac cgaaagcggc gccctcggtc      360
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc      420
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc      480
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc      540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc      600
acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a                651

```

15 <210> 55

<210> 55

ES 2 806 146 T3

< 211> 645

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

5 < 221> misc_feature

< 223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de Ab8

<400> 55

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtca gggcattagc aattatntag cctggtttca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaagggtg ggteccatca      180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttatta ctgccaacaa tattataatt acccattcac tttcggcctt      300
gggaccacag tggatatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgccca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                          645

```

<210> 56

10 < 211> 214

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

15 < 223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab1

<400> 56

ES 2 806 146 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 57

5 <211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab2

<400> 57

ES 2 806 146 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 58

5 <211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab4

<400> 58

ES 2 806 146 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ile Gln Thr
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 59

5 <211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab5

<400> 59

ES 2 806 146 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

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

Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 60

5 <211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab6

<400> 60

ES 2 806 146 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Arg Ser Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Leu Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 61

5 <211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab7

<400> 61

ES 2 806 146 T3

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

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

Tyr Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Val Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Ser
 85 90 95

Leu Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 62

5 < 211> 214

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

10 < 223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Ab8

<400> 62

ES 2 806 146 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 63

5 < 211> 107

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

10 < 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab1

<400> 63

ES 2 806 146 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 64

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab2

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

<210> 65

ES 2 806 146 T3

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

5 < 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab3

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Ile Ser Pro
85 90 95

Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 66

10 < 211> 112

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

15 < 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab4

<400> 66

ES 2 806 146 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ile Gln Thr
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 67

5 < 211> 109

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

10 < 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab5

<400> 67

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 68

< 211> 110

ES 2 806 146 T3

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

5 < 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab6

<400> 68

```

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn
          20          25          30

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

Ile Tyr Arg Ser Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
          50          55          60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Leu Ser Gly Leu Arg
65          70          75          80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
          85          90          95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105          110
    
```

10 <210> 69

< 211> 111

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

15 < 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab7

<400> 69

ES 2 806 146 T3

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

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

Tyr Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Val Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Ser
85 90 95

Leu Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 70

< 211> 107

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de Ab8

<400> 70

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

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

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

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

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

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

10 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 71

< 211> 11

< 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 5 < 223> Ab1 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera
 <400> 71
Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Arg Tyr Phe Asn
 1 5 10
 <210> 72
 < 211> 11
 10 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab2
 15 <400> 72
Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Arg Tyr Phe Asn
 1 5 10
 <210> 73
 < 211> 12
 < 212> PRT
 20 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab3
 <400> 73
Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Asn Tyr Leu Ala
 25 1 5 10
 <210> 74
 < 211> 16
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 30 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab4
 <400> 74
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15
 35 <210> 75
 < 211> 12

< 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 5 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab5
 <400> 75
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
 <210> 76
 < 211> 13
 10 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab6
 15 <400> 76
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Tyr Val Tyr
1 5 10
 <210> 77
 < 211> 14
 < 212> PRT
 20 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab7
 <400> 77
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val Asn
 25 **1 5 10**
 <210> 78
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 30 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera de Ab8
 <400> 78
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10
 35 <210> 79
 < 211> 7

< 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 5 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de Ab1
 <400> 79
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 80
 < 211> 7
 10 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Ab2 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera
 15 <400> 80
 Ala Glu Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 81
 < 211> 7
 < 212> PRT
 20 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera de Ab2
 <400> 81
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 25 1 5
 <210> 82
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 30 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Ab4 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera
 <400> 82
 Leu Gly Ser Tyr Arg Ala Ser
 1 5
 35 <210> 83
 < 211> 7

< 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 5 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab1
 <400> 87
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 88
 10 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 15 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab2
 <400> 88
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 89
 < 211> 9
 20 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Ab3 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera
 25 <400> 89
Gln Gln Tyr Gly Ile Ser Pro Cys Ser
 1 5
 <210> 90
 < 211> 9
 < 212> PRT
 30 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab4
 <400> 90
Ile Gln Thr Leu Gln Thr Pro Phe Thr
 35 1 5

<210> 91
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 5 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Ab5 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera
 <400> 91
Leu Gln Ser Gly Ser Ser Val Pro Leu Thr
 1 5 10

10 <210> 92
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 15 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab6
 <400> 92
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val Val
 1 5 10

<210> 93
 20 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE

25 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab7
 <400> 93
Gln Ser Tyr Asp Thr Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10

<210> 94
 < 211> 9
 30 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera de Ab8

35 <400> 94
Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión al antígeno CD27L que comprende
un dominio variable de las cadenas ligeras y un dominio variable de las cadenas pesadas, en donde
- 5 a) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende una LCDR1 como se expone en SEQ ID NO: 74; una LCDR2 como se expone en SEQ ID NO: 82; y una LCDR3 como se expone en SEQ ID NO: 90; y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende una HCDR1 como se expone en SEQ ID NO: 28; una HCDR2 como se expone en SEQ ID NO: 36; y una HCDR3 como se expone en SEQ ID NO: 44;
- 10 b) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero tiene una mutación R24K-S26G, y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 pero tiene una mutación N31S-I34M;
- c) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero tiene una mutación R24K-S26G, y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;
- 15 d) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero tiene una mutación L55I-Y58F, y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;
- e) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero tiene una mutación Q95N-T96S, y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 pero tiene una mutación N31S-I34M; o
- 20 f) el dominio variable de las cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero tiene una mutación Q95N-T96S, y el dominio variable de las cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20.
2. La proteína de unión al antígeno CD27L según la reivindicación 1, que comprende
- 25 a) un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene por lo menos 90% identidad o por lo menos 95% identidad a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 66, o que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66;
- b) un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene por lo menos 90% identidad o por lo menos 95% identidad a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20, o que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;
- 30 c) el dominio variable de las cadenas ligeras de a) y el dominio variable de las cadenas pesadas de b);
- d) un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 66;
- e) un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20; o
- 35 f) el dominio variable de las cadenas ligeras de d) y el dominio variable de las cadenas pesadas de e).
3. La proteína de unión al antígeno CD27L según la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína de unión al antígeno se une específicamente a CD27L humano con una afinidad inferior o igual a 2×10^{-11} M.
4. La proteína de unión al antígeno CD27L según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína de unión al antígeno inhibe la unión de CD27L a CD27.
- 40 5. La proteína de unión al antígeno CD27L según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo humano.
6. La proteína de unión al antígeno CD27L según la reivindicación 5, que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58, y que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12.
- 45 7. La proteína de unión al antígeno CD27L según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la proteína de unión al antígeno CD27L es un anticuerpo biespecífico.
8. La proteína de unión al antígeno CD27L según la reivindicación 7, en donde el anticuerpo biespecífico se une a CD27L y a un antígeno de las células efectoras que es CD3.

9. La proteína de unión al antígeno CD27L según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la proteína de unión al antígeno CD27L es un fragmento de anticuerpo.
10. La proteína de unión al antígeno CD27L según la reivindicación 9, en donde el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en fragmentos F(ab), Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, fragmentos F(ab')₂, Fv, Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo, fragmentos dAb, moléculas Fv monocatenarias (scFv), dímeros Fv monocatenarios biespecíficos, diacuerpos y triacuerpos.
11. La proteína de unión al antígeno CD27L según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la proteína de unión al antígeno CD27L se conjuga a un agente quimioterapéutico, preferiblemente mediante un enlazador, en donde el enlazador es preferiblemente un enlazador no escindible, que preferiblemente comprende MCC.
12. La proteína de unión al antígeno CD27L según la reivindicación 11, en donde el agente quimioterapéutico se conjuga a una o más lisinas contenidas con un polipéptido de la proteína de unión al antígeno CD27L.
13. La proteína de unión al antígeno CD27L según la reivindicación 11 o 12, en donde el agente quimioterapéutico es DM1.
14. Una composición que comprende una proteína de unión al antígeno CD27L según la reivindicación 13, en donde el número promedio de moléculas DM1 por proteína de unión al antígeno CD27L oscila entre 1 y 10, preferiblemente entre 3 y 7, preferiblemente entre 4 y 6, o 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0.
15. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión al antígeno CD27L, preferiblemente en donde la composición farmacéutica se liofiliza.
16. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido, en donde dicho polipéptido comprende:
- a) un dominio variable de las cadenas ligeras que comprende una LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; una LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 82; y una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 90; y un dominio variable de las cadenas pesadas que comprende una HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 28; una HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 36; y una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 44;
- b) un dominio variable de las cadenas ligeras que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero que tiene una mutación R24K-S26G o una mutación Q95N-T96S; y un dominio variable de las cadenas pesadas que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 pero que tiene una mutación N31S-I34M; o
- c) un dominio variable de las cadenas ligeras que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 pero que tiene una mutación L55I-Y58F; y un dominio variable de las cadenas pesadas que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20.
17. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 16, en donde
- a) el ácido nucleico aislado comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 80% idéntica, preferiblemente por lo menos 90% idéntica, preferiblemente por lo menos 95% idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:51, o comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:51;
- b) el ácido nucleico aislado comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 80% idéntica, preferiblemente por lo menos 90% idéntica, preferiblemente por lo menos 95% idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:5; o comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:5;
- c) el polipéptido comprende un dominio variable de las cadenas ligeras que tiene
- i) por lo menos 95% identidad a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 66;
- ii) no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 66; o
- iii) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 66; o
- d) el polipéptido comprende un dominio variable de las cadenas pesadas que tiene
- i) por lo menos 95% identidad a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20;
- ii) no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20; o

- iii) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20.
18. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado según la reivindicación 16 o 17.
19. Una célula hospedante recombinante que comprende un ácido nucleico aislado según la reivindicación 16 o 17 operativamente enlazado a un promotor, o que comprende un vector de expresión según la reivindicación 18.
- 5 20. Un método para elaborar un conjugado de anticuerpo CD27L y fármaco, en donde dicho método comprende las etapas de:
- (i) a) proporcionar una proteína de unión al antígeno CD27L según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10
- b) conjugar la proteína de unión al antígeno CD27L a un enlazador; y
- c) conjugar un fármaco a dicho enlazador;
- 10 en donde el enlazador preferiblemente comprende MCC; el fármaco preferiblemente comprende DM1; o el enlazador preferiblemente comprende MCC y el fármaco preferiblemente comprende DM1; o
- (ii) a) proporcionar una proteína de unión al antígeno CD27L según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y
- b) conjugar un enlazador covalentemente unido a un fármaco, a dicha proteína de unión al antígeno CD27L.
- 15 21. Una proteína de unión al antígeno CD27L según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 conjugada a DM1 a través de un enlazador MCC, para uso en un método para tratar cáncer, en donde dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha proteína de unión al antígeno CD27L a un paciente que lo necesita.
22. La proteína de unión al antígeno CD27L para uso según la reivindicación 21, en donde la proteína de unión al antígeno CD27L está comprendida en una composición farmacéutica.
- 20 23. La proteína de unión al antígeno CD27L para uso según la reivindicación 22, en donde el anticuerpo comprende la función efectora potenciada.
24. La proteína de unión al antígeno CD27L para uso según la reivindicación 23, en donde el número promedio de moléculas DM1 por anticuerpo oscila entre 1 y 10, preferiblemente entre 3 y 7, preferiblemente entre 4 y 6, o es 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0.
- 25 25. La proteína de unión al antígeno CD27L para uso según cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en donde una muestra del paciente, preferiblemente una muestra de sangre o una biopsia, se ensaya para expresión de CD27L, preferiblemente para expresión de ARNm de CD27L o para expresión de la proteína CD27L.
26. La proteína de unión al antígeno CD27L para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en donde el cáncer es carcinoma de células renales (RCC), RCC de células claras, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, 30 cáncer de mama, tumor cerebral, carcinoma nasofaríngeo, linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de Burkitt, linfomas de células grandes anaplásicas (ALCL), mieloma múltiple, linfomas de células T cutáneas, linfomas de células escindidas pequeñas nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas de células T periféricas, linfomas de Lennert, linfoma inmunoblástico, leucemia/linfomas de células T (ATLL), leucemia de células T (T-ALL), cáncer de linfoma folicular centroblastico/centrocítico (cb/cc), linfoma de células grandes difusas de linaje B, linfoma de células T de tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfoma basado 35 en la cavidad corporal asociado con VIH, carcinoma embrionario, carcinoma no diferenciado de la rinofaringe, enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom o linfoma de células B.

	Epitopo Bin	Afinidad Hu Biacore K_D nM	Célula nativa Avidéz CE50 nM	Cyno Avidéz CE50 nM	ADCC CE50 nM	ADCP CE50 pM	CDC # CE50 nM	Internalización $T_{1/2}$ (h)
CD27L anti-humano de ratón quimérico	3	1,25	0,60	2,22	0,195	2,17	2,64	0,41
Ab1	1	0,62	0,32	0,05	0,021	1,12	1,0	1,03
Ab2	1	0,59	0,24	0,24	0,034	1,19	1,17	0,69
Ab3	1	4,35	4,18	2,80	0,715	64,8	10,6	0,49
Ab4	3	3,05	0,25	0,48	0,332	1,55	1,54	0,30
Ab5	2	10,4	0,66	1,40	0,422	2,36	5,28	0,75
Ab6	4	6,06	0,87	0,87	0,167	1,88	4,20	1,08
Ab7	4	0,71	0,18	0,43	0,076	0,80	0,64	0,43
Ab8	2	10,8	0,09	0,34	> 67	1,60	> 67	1,81

FIG. 1

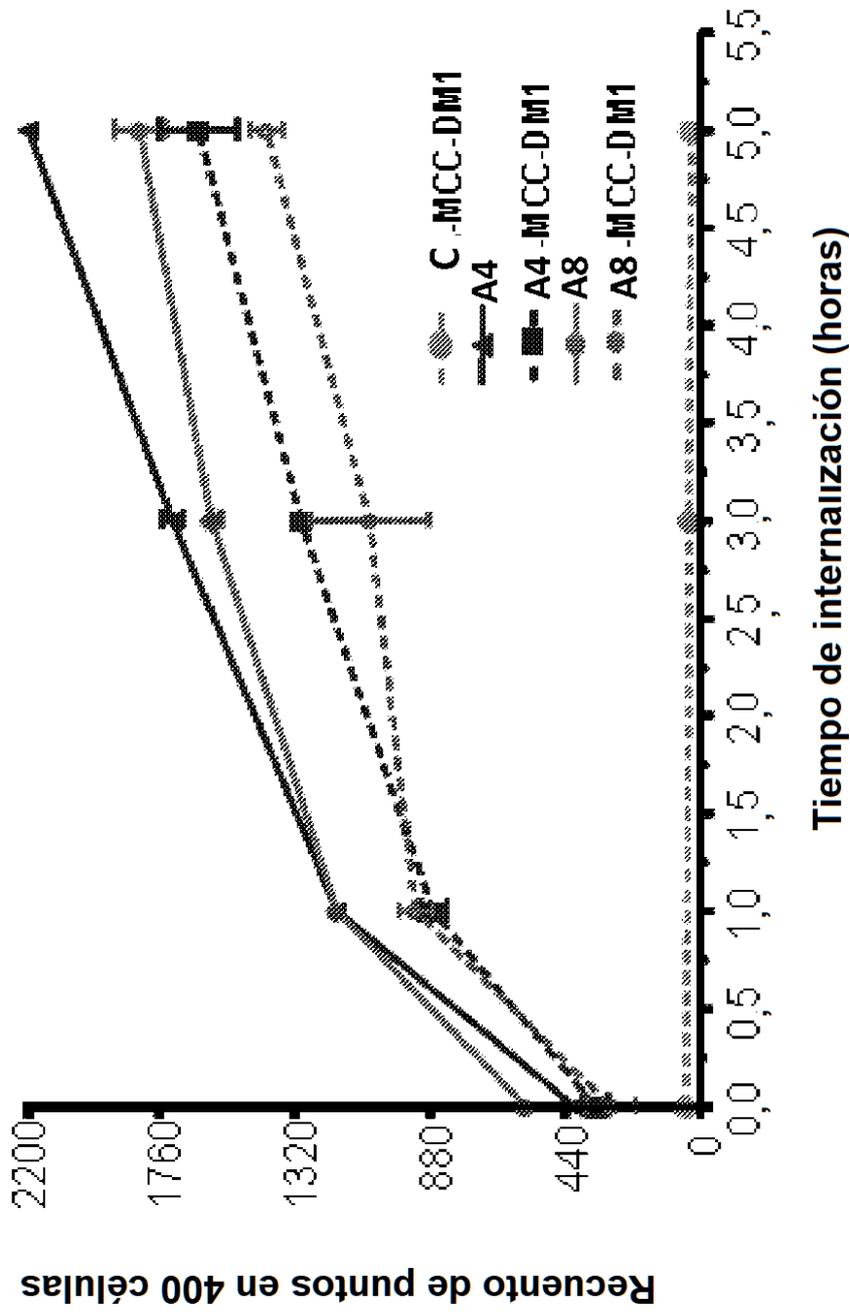


FIG. 2

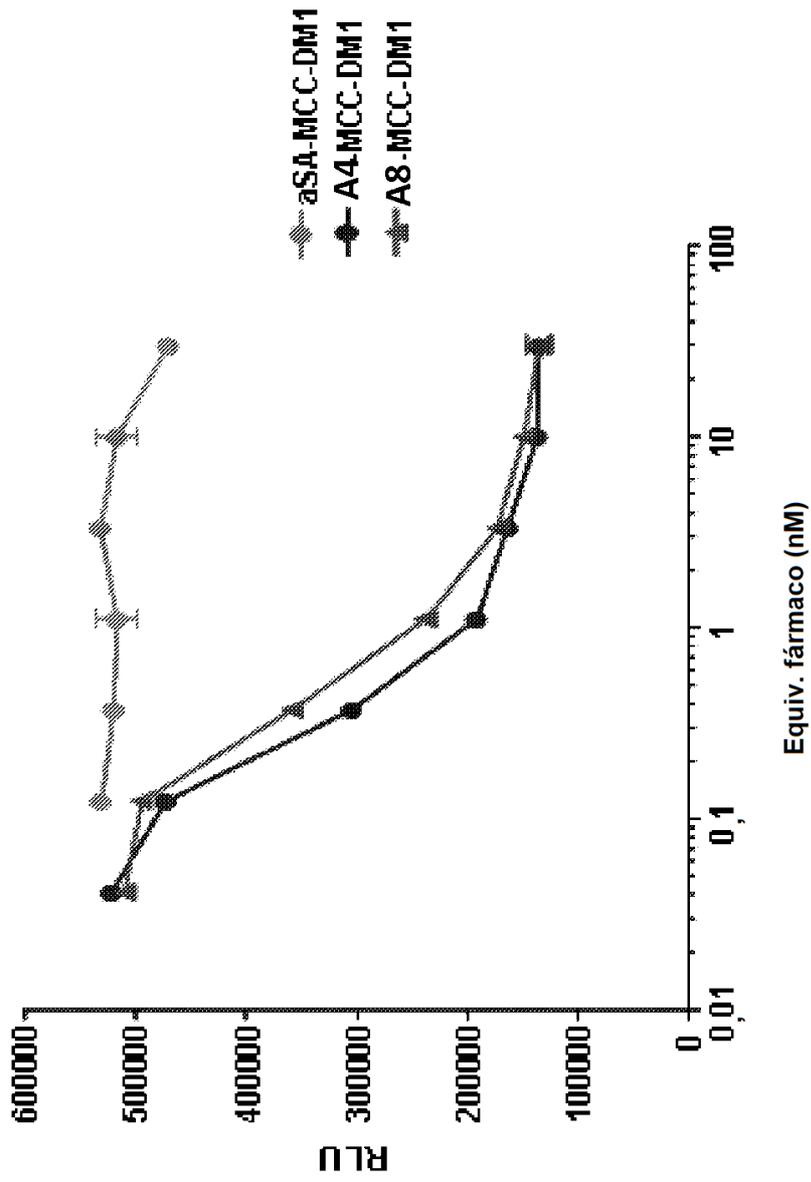


FIG. 3

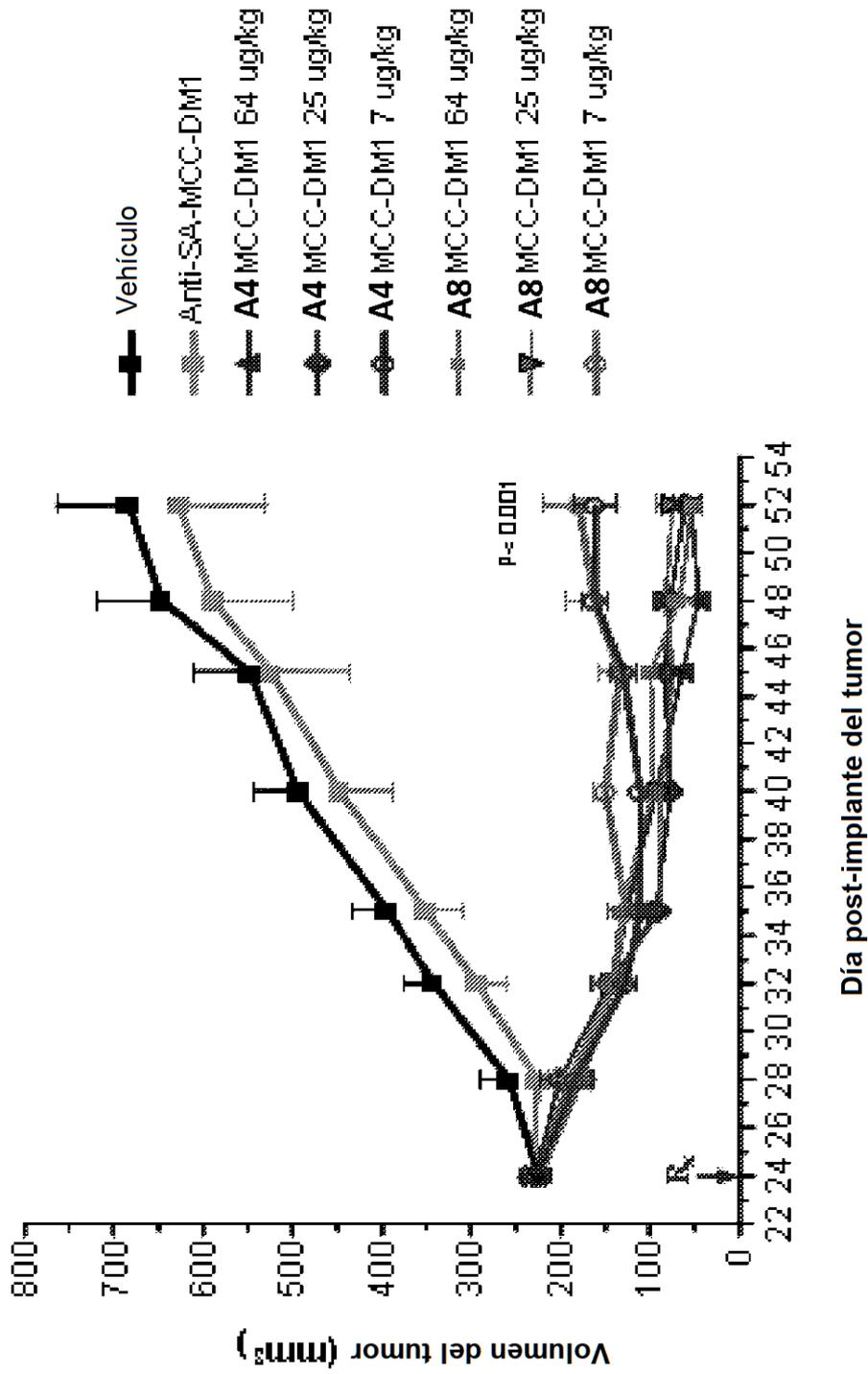


FIG. 4

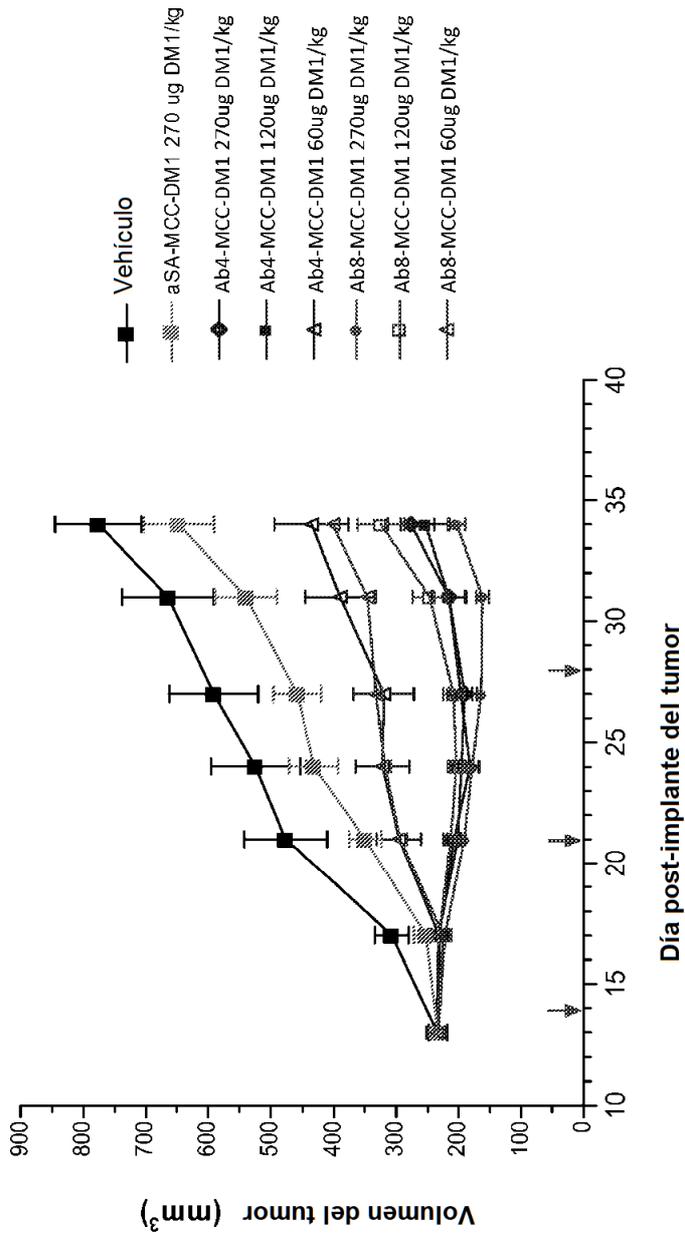


FIG. 5

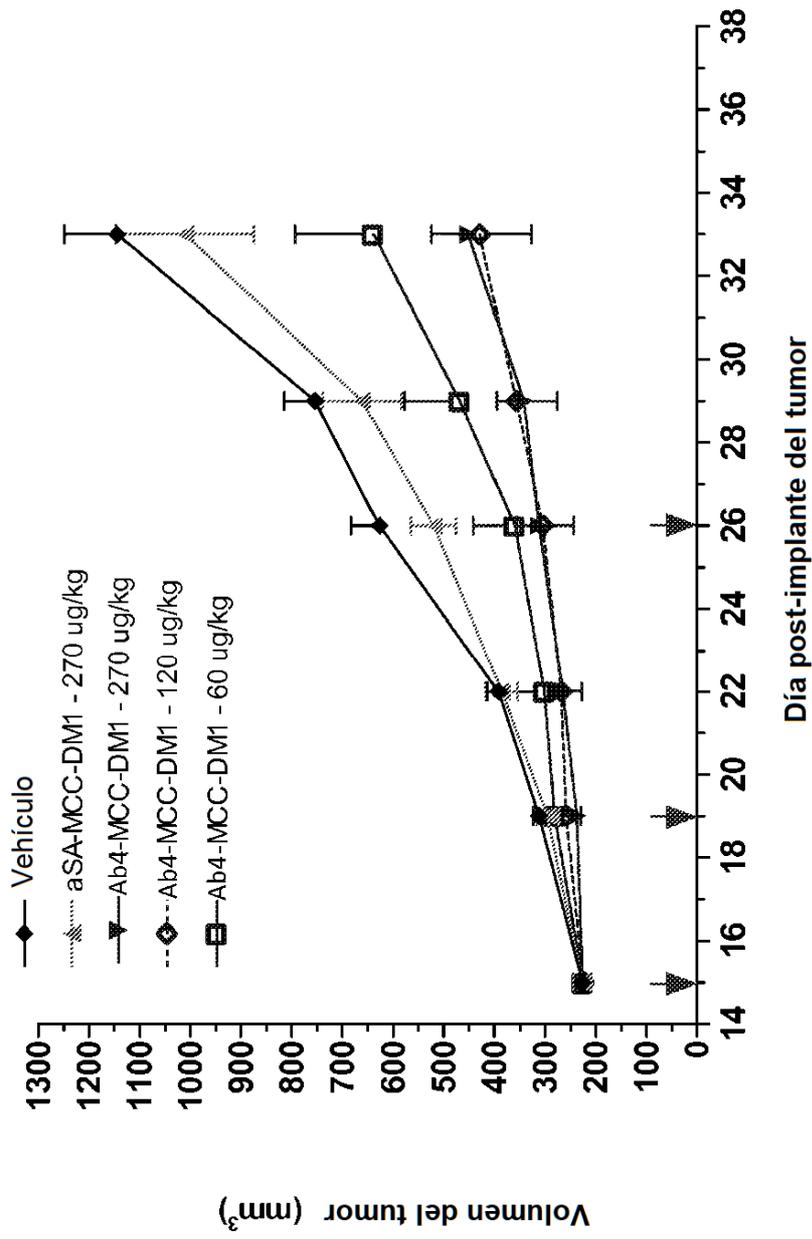


FIG. 6

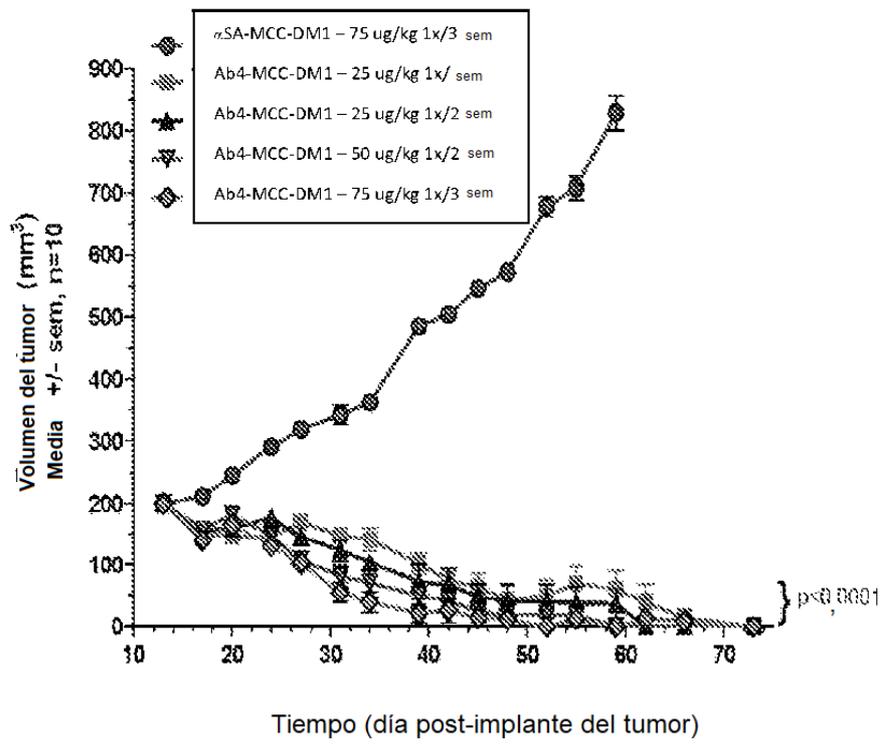


Figura 7

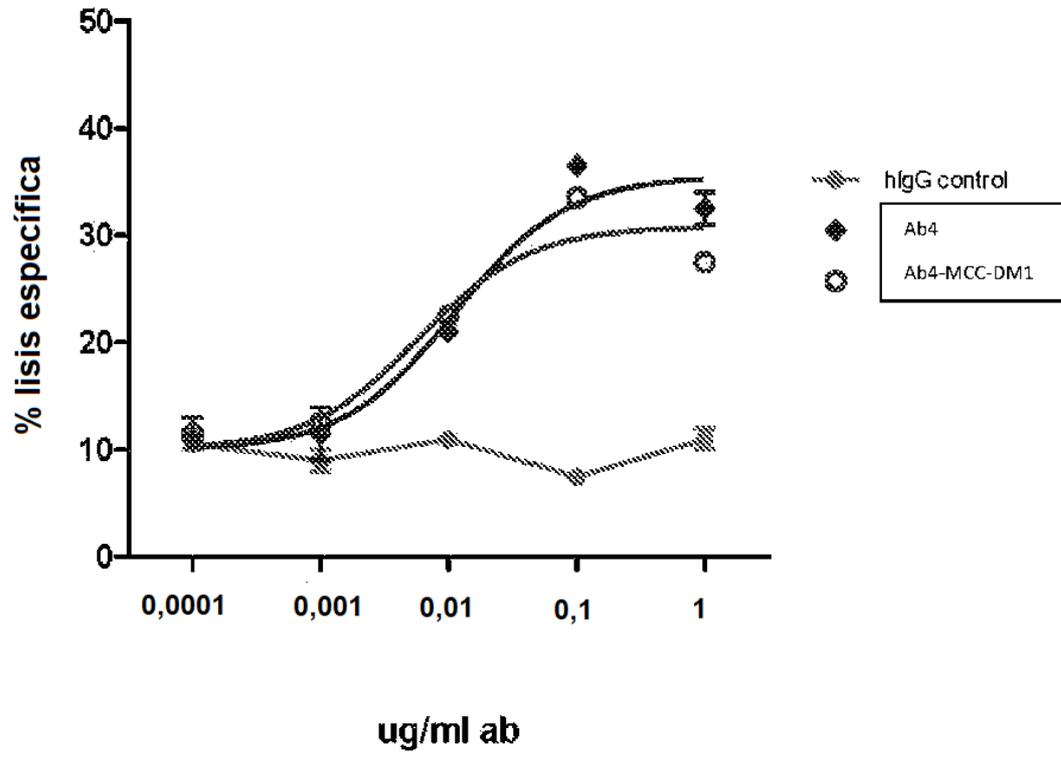


FIG. 8

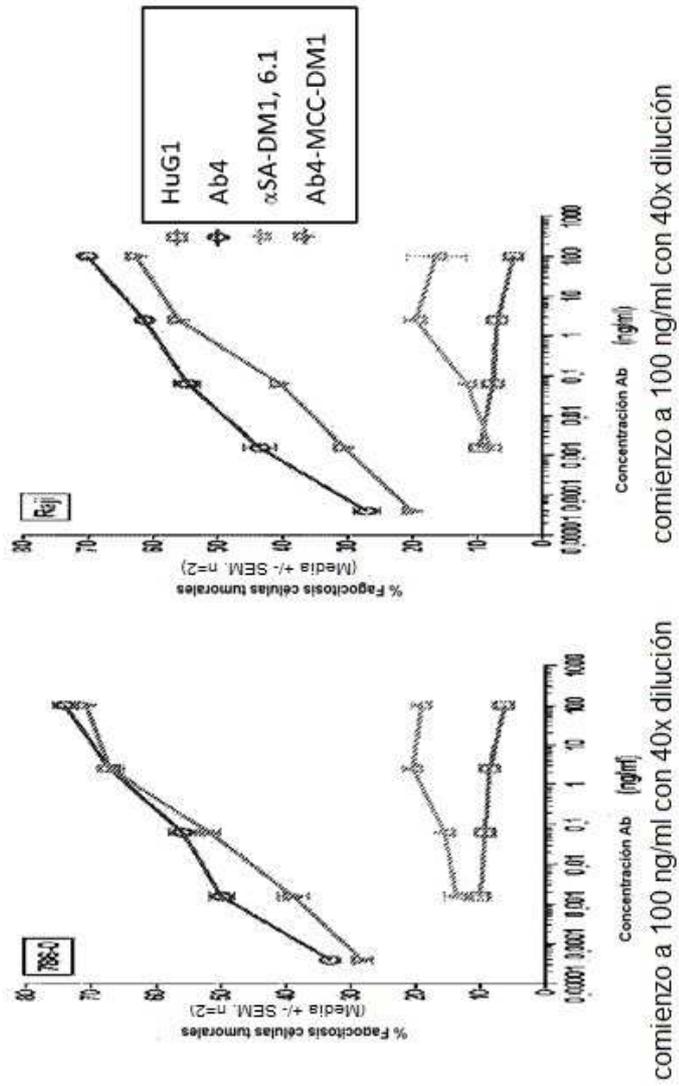


FIG. 9

Comparación de expresión de CD27L (sitios estimados/célula) para muestras congeladas de tumor primario calificadas "positivas" por IHC enmascarado

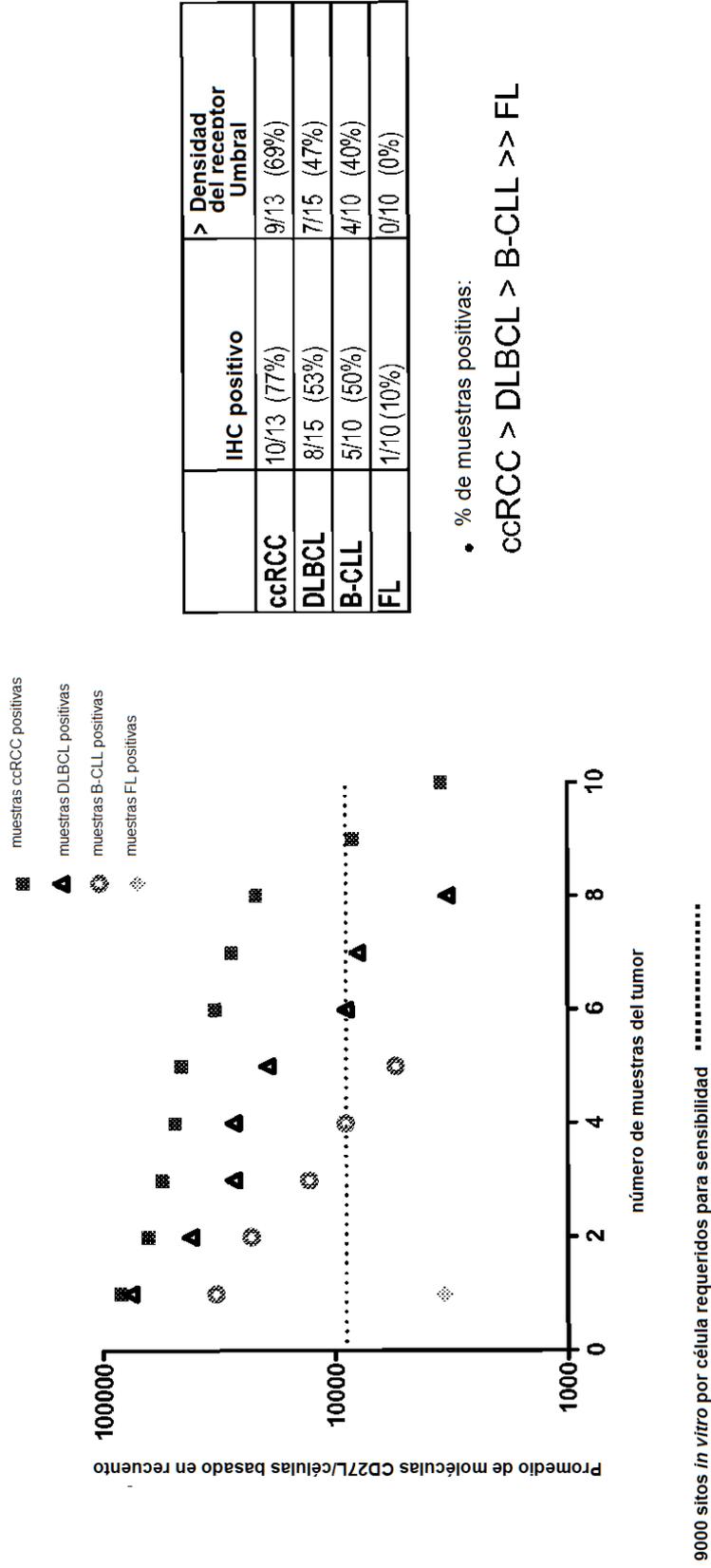


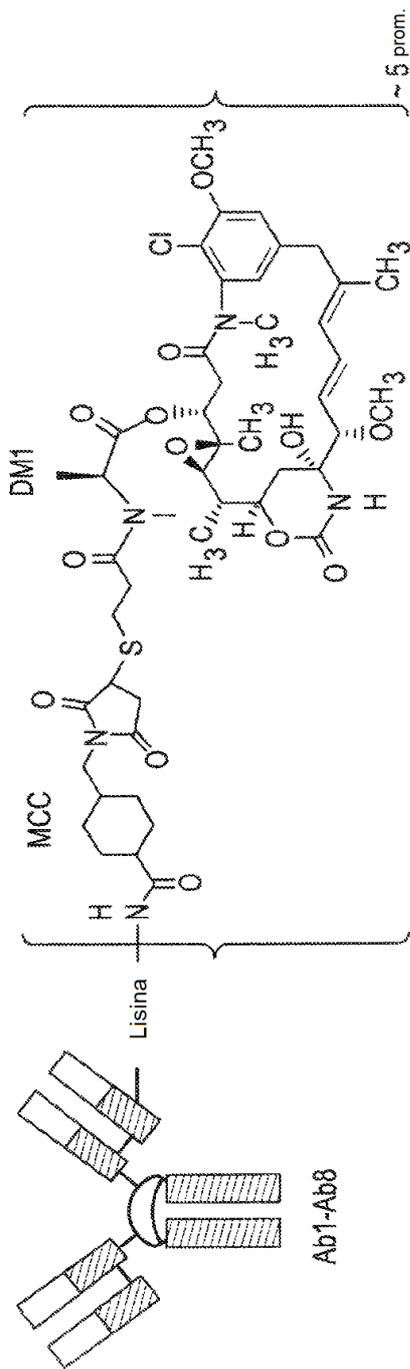
FIG. 10

Tipo de tumor	Expresión de ARNm		Expresión de proteína			
			IHC		Citometría de flujo	
	Bibliografía	Amgen	Bibliografía	Amgen	Bibliografía	Amgen
Carcinoma de células renales claras incorporadas en OCT				100% (n=41/41)		100% (n=13/13)
		86% (n=6/7)			n.d.	n.d.
		100% (n=10/10)	90% (n=44/49) 94% (n=44/47)			
FFPE			82% (n=189/230)			
Subconjuntos B-NHL (congelados)						
Linfoma de células B grandes difusas	85% (n=335/414)	100% (n=30/30) 100% (n=15/15)	71% (n=15/21)	67% (n=10/15)	n.d.	n.d.
Linfoma folicular	n.d.	64% (n=21/33) 100% (n=10/10)	33% (n=6/18)	50% (n=5/10)	n.d.	n.d.
Linfoma de células del manto	n.d.	100% (n=10/10)	25% (n=1/4)	n.d.	n.d.	n.d.
Leucemia linfocítica crónica (congelada)	n.d.	75% (n=21/28) 90% (n=9/10)	50% (n=3/6)	50% (n=5/10)	90% (17/19)	100% (11/11)

IHC = inmunohistoquímica
qPCR = PCR cuantitativa
n.d. = no determinado

Resultados de ARNm Amgen; entre 35 y 50% de SCCH&N (principalmente ESO) aproximadamente 14% de muestras de ovarios de pacientes expresan CD27L; 40% de RCC papilar expresan CD27L

FIG. 11



Enlazador: MCC:4-[N-maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato (SMCC material de partida)

Fig. 12