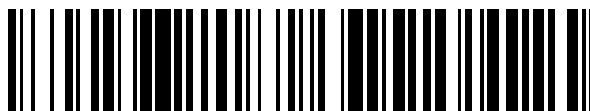


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 868 650**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2017** **PCT/US2017/017337**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017** **WO17142800**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2017** **E 17706644 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.03.2021** **EP 3416984**

54 Título: **Anticuerpo quimérico anti-CD20 canina**

30 Prioridad:

18.02.2016 US 201662296729 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.10.2021

73 Titular/es:

ELANCO US INC. (100.0%)
2500 Innovation Way
Greenfield, IN 46140, US

72 Inventor/es:

PANCOOK, JAMES DAVID

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 868 650 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

Anticuerpo quimérico anti-CD20 canina

La presente solicitud contiene una Lista de Secuencias que ha sido presentado electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora a la presente memoria en su totalidad a modo de referencia. Dicha copia ASCII, creada el 10 de febrero de 2016, tiene el nombre "P20914 sequence listing" y tiene un tamaño de 14 Kb.

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CD20 quiméricos caninizados de la proteína CD20 canina, y a métodos de uso para tratar determinados trastornos tales como el linfoma no Hodgkin de células B en perros.

Los linfomas caninos son un grupo diverso de cánceres, y se encuentran entre los cánceres más comunes diagnosticados en perros. Colectivamente representan aproximadamente el 7-14% de todos los cánceres diagnosticados en perros. Existen más de 30 tipos descritos de linfoma canino, y dichos cánceres varían enormemente en su comportamiento. Algunos progresan rápidamente y suponen una amenaza aguda para la vida si no hay tratamiento, mientras que otros progresan muy lentamente y se tratan como enfermedades crónicas indolentes. Los linfomas pueden afectar a cualquier órgano del cuerpo, pero lo más habitual es que se originen en los nodos linfáticos, antes de extenderse a otros órganos como el bazo, el hígado y la médula ósea.

La CD20 es una proteína de superficie celular con cuatro regiones de extensión transmembrana. La molécula CD20 está implicada en la regulación de la proliferación y la diferenciación de células B. La molécula CD20 está presente exclusivamente sobre la superficie de casi todas las células B, tanto normales como malignas. El documento WO2016/016859 proporciona una única construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que se une a un antígeno diana de la superficie celular a través de un primer dominio y al antígeno CD3 de la superficie de las células T a través de un segundo dominio. El ejemplo 5 presenta la construcción de anticuerpos biespecíficos CD20/CD3.

El rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico contra la proteína CD20 humana, que se encuentra principalmente en la superficie de las células B del sistema inmunitario. El rituximab destruye células B y por tanto se usa para tratar enfermedades en humanos que se caracterizan por un número excesivo de células B, células B sobre-reativas o células B disfuncionales. Esto incluye muchos linfomas, leucemias, rechazo de trasplante y trastornos autoinmunes.

El rituximab destruye células B humanas, tanto normales como malignas, que presentan CD20 en sus superficies. El efecto da como resultado la eliminación de células B (incluyendo las cancerosas) del cuerpo, permitiendo el desarrollo de una nueva población de células B sanas a partir de células madre linfoides.

Desafortunadamente, todavía no existe una cura para los linfomas caninos y existe una necesidad de más y diferentes terapias que puedan demostrar su eficacia en su tratamiento.

K9LO-133 es un anticuerpo anti-CD20 quimérico dirigido a los linfocitos B maduros en perros. El K9LO-133 se une al CD20 de los linfocitos B caninos. El K9LO-133 es potencialmente útil para el tratamiento de linfoma no Hodgkin de células B y otros tipos de linfomas en perros.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que se use de manera específica a CD20 canina. La presente invención también proporciona un método para tratar linfoma en un paciente canino mediante la administración a un paciente canino de cáncer de linfoma que necesita dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a CD20 canina. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo que se une específicamente a CD20 canina, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La presente invención también proporciona un anticuerpo que se une específicamente a CD20 canina y también se une a proteína A.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa los niveles en suero de linfocitos B CD21+ y CD22+ y de linfocitos T CD4+ y CD8+ entre -5 y 37 días en perros tratados con el anticuerpo K9LO-133.

Descripción detallada

A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" (Ab) se refiere a una molécula de inmunoglobulina que comprende dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) interconectadas por puentes de disulfuro. La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a aproximadamente 110 aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos a través de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) contenidas en los mismos. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a cualquier fragmento de anticuerpo que retiene la capacidad de unirse a su antígeno. Dichos "fragmentos de unión a antígeno" pueden seleccionarse del grupo que consiste en los fragmentos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc, y diacuerpos. Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos una región variable. Preferiblemente, un fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una

región variable de cadena ligera (LCVR). Más preferiblemente, un fragmento de unión a antígeno como el usado en la presente memoria comprende una HCVR y una LCVR que confieren especificidad de unión a antígeno para CD20 canina (es decir, un “fragmento de unión a CD20 canina”).

Tal como se usan en la presente memoria, los términos “región determinante de complementariedad” y “CDR” se refieren a los sitios de combinación de antígeno no contiguos presentes dentro de la región variable de los polipéptidos LC y HC de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Estas regiones particulares han sido descritas por otros, incluyendo Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-93 (1971); Kabat, et al., J Biol. Chem. 252: 6609-6616 (1977); Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N.º 91-3242 (1991); Chothia, et al, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); MacCallum, et al., J. Mol. Biol., 262: 732-745 (1996); y North, et al., J. Mol. Biol., 406: 228-256 (2011), donde las definiciones incluyen solapamientos o subconjuntos de residuos de aminoácido cuando se comparan entre ellas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “región variable de cadena ligera” se refiere a una porción de una LC de una molécula de anticuerpo que incluye las secuencias de aminoácido de regiones determinantes de complementariedad (CDRs; es decir, LCDR1, LCDR2 y LCDR3), y regiones estructurales ligeras (LFRWs).

Tal como se usa en la presente memoria, el término “región variable de cadena pesada (HCVR)” se refiere a una porción de una HC de una molécula de anticuerpo que incluye las secuencias de aminoácido de regiones determinantes de complementariedad (CDRs; es decir, HCDR1, HCDR2 y HCDR3), y regiones estructurales pesada (HFRWs).

Las CDRs están intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones estructurales (“FRW”). Cada LCVR y HCVR está compuesta de tres CDRs y cuatro FRWs, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FRW1, CDR1, FRW2, CDR2, FRW3, CDR3, FRW4. Las tres CDRs de la cadena ligera se denominan “LCDR1, LCDR2 y LCDR3” y las tres CDRs de la HC se denominan “HCDR1, HCDR2 y HCDR3”. Las CDRs contienen la mayoría de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La numeración y la posición de los residuos de aminoácido de CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR son según las convenciones conocidas (p.ej., Kabat (1991), Chothia (1987) y/o North (2011)). En diferentes realizaciones de la invención, las FRWs del anticuerpo pueden ser idénticas a las secuencias de línea germinal, o pueden estar modificadas natural o artificialmente.

En determinados aspectos el Ab anti-CD20 para los métodos y/o usos de la presente invención es alterado para aumentar o disminuir el grado de glicosilación del anticuerpo. La adición o la eliminación de sitios de glicosilación en un anticuerpo puede llevarse a cabo de forma conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de tal modo que se crea o se elimina uno o más sitios de glicosilación.

A menos que se indique de otro modo, cuando se hace referencia a un residuo de aminoácido de un anticuerpo mediante un número, en la presente memoria se utiliza el sistema de numeración EU tal como se utiliza de forma convencional en la técnica (véase, Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N.º 91-3242 (1991), por ejemplo).

Tal como se usa en la presente memoria, el término “kit” se refiere a un paquete que comprende al menos dos contenedores separados, donde un primer contenedor contiene un Ab K9LO-133 y un segundo contenedor contiene vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en la presente memoria, el término “kit” también se refiere a un paquete que comprende al menos dos contenedores separados, donde un primer contenedor contiene Ab K9LO-133, y otro anticuerpo preferiblemente para el tratamiento de cánceres distintos de los linfomas. Un “kit” también puede incluir instrucciones para administrar la totalidad o una porción del contenido de dichos primer y segundo contenedores a un paciente de cáncer. Opcionalmente, dichos kits también incluyen un tercer contenedor que contiene una composición que comprende un agente quimioterapéutico conocido.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos “que trata”, “tratar” o “tratamiento” se refieren a contener, frenar, detener, reducir o revertir la progresión o la gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existentes.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad o dosis de un Ab anti-CD20 caninizado que, tras una administración de dosis individual o múltiple al paciente, proporciona una respuesta efectiva en el paciente que está siendo diagnosticado o tratado.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos “respuesta efectiva” de un paciente o una “capacidad de respuesta” de un paciente a un tratamiento con una combinación de agentes, o “efecto terapéutico” se refiere al beneficio(s) clínico(s) o terapéutico(s) proporcionado(s) a un paciente tras la administración de un Ab anti-CD20 caninizado. Dicho(s) beneficio(s) incluye(n) uno cualquiera o más de: mejora de la supervivencia (que incluye la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión); dar como resultado una respuesta objetivo (que incluye una respuesta completa o una respuesta parcial); disminuir la cantidad de células B, disminuir la concentración de células B en la sangre de un paciente o en otros tejidos o fluidos, regresión tumoral, reducción del peso o del tamaño del tumor, ampliación del tiempo de progresión de la enfermedad, aumento de la duración de la supervivencia, mayor

supervivencia libre de progresión, tasa de respuesta global mejorada, aumento de la duración de respuesta, y mejora de la calidad de vida y/o mejora de los signos o síntomas del cáncer, etc.

La persona responsable del diagnóstico, tal como un especialista en la técnica, puede determinar fácilmente una cantidad eficaz mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Para determinar la cantidad eficaz para un paciente, la persona responsable del diagnóstico considera una serie de factores, que incluyen, aunque sin limitación: la especie o raza del paciente; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad o trastorno específicos implicados; el grado, o la implicación, o la gravedad, de la enfermedad o trastorno; la respuesta de paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

K9LO-133

AME-133V es un anticuerpo monoclonal de IgG1 humanizado de segunda generación. K9LO-133 es una versión de anticuerpo monoclonal de isotipo C parcialmente caninizado (regiones variables humanas con regiones constantes caninas) del AME-133V que se une específicamente a la proteína CD20 en perros.

En una realización, K9LO-133 contiene regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, CDRs y estructuras diseñadas. En una realización, se introduce una variante de residuo en la LCDR1 del K9LO-133. En una realización, la variante de residuo de la LCDR1 del K9LO-133 es V165G. En una realización, se introduce una variante de región de bisagra. En una realización, se añade una región variante por debajo de la bisagra. En una realización, la región variante por debajo de la bisagra permite al K9LO-133 unirse a proteína A.

K9LO-133 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada correspondiente a la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2 que codifica para los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. K9LO-133 tiene una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3. La región de secuencia variable de cadena pesada consta además de HFWK1 (SEQ ID NO: 4), HCDR1 (SEQ ID NO: 5), HFWK2 (SEQ ID NO: 6), HCDR2 (SEQ ID NO: 7), HFWK3 (SEQ ID NO: 8), HCDR3 (SEQ ID NO: 9).

K9LO-133 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena ligera correspondiente a la SEQ ID NO: 10 y una secuencia de nucleótidos correspondiente a la SEQ ID NO: 11 que codifica para los aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. K9LO-133 tiene una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12. La región de secuencia variable de cadena ligera consta además de LFWK1 (SEQ ID NO: 13), LCDR1 (SEQ ID NO: 14), LFWK2 (SEQ ID NO: 15), LCDR2 (SEQ ID NO: 16), LFWK3 (SEQ ID NO: 17), LCDR3 (SEQ ID NO: 18), y una región J (SEQ ID NO: 19).

Expresión de CD20 en tejido de linfoma canino

La expresión de CD20 en tejido de linfoma canino puede evaluarse usando inmunohistoquímica (IHC) con AME-133V y K9LO-133. Para detectar la unión, AME-133V y K9LO-133 se pueden aplicar a criosecciones de muestras de linfoma canino a una concentración, por ejemplo, de 10 µg/mL. Adicionalmente, AME-133V y K9LO-133 pueden sustituirse por un anticuerpo de control negativo de la especie apropiada y de igual isotipo, que presente una especificidad antigénica diferente de los anticuerpos de detección, por ejemplo, IgG1 humana, designada HulgG1 (para AME-133V), e IgG de perro, designada DglgG (para K9LO-133). Se pueden producir otros controles por omisión de los anticuerpos de detección o los anticuerpos de control negativo del ensayo (control de ensayo).

Cuando se evalúan esencialmente como se ha descrito anteriormente, AME-133V y K9LO-133 produjeron tinción 3+ de >75% de los leucocitos mononucleares de control positivo. Para K9LO-133, la tinción 3+ se observó en linfocitos de la pulpa blanca del bazo canino. AME-133V y K9LO-133 no reaccionaron específicamente con los miocitos lisos del control negativo (específicamente núcleos para K9LO-133) del bazo canino. Los anticuerpos de control negativo, HulgG1 y DglgG, no reaccionaron específicamente con los elementos de tejido de control positivo o negativo en el bazo canino. Tampoco se produjo tinción de los portaobjetos del ensayo de control. Las reacciones específicas de AME-133V y K9LO-133 con el elemento de tejido de control positivo y la falta de reactividad específica con el elemento de tejido de control negativo, así como la falta de reactividad del anticuerpo de control negativo, indicaron que el ensayo era sensible, específico y reproducible.

Se detectó CD20 en >75% de las células neoplásicas en 8 de 10 muestras de linfoma canino examinadas. En las otras muestras, el 1-5% de las células neoplásicas fueron teñidas positivamente para CD20.

Perros tratados con K9LO-133

La dosis humana de rituximab correspondiente al tratamiento de linfoma no Hodgkin es de 375 mg/m². Generalmente, una dosis quimioterapéutica canina es el 40% de una dosis humana, independientemente del tipo de cáncer. Por tanto, y sin pretender establecer ninguna teoría, una dosis inicial apropiada de un anticuerpo anti-CD20 para linfoma no Hodgkin canino es de aproximadamente 150 mg/m². Para ajustar al área superficial del cuerpo de un perro de 7 kg, el número de 150 mg/m² se corrigió multiplicando por 0,37. La dosis resultante de K9LO-133 administrada a los perros fue de aproximadamente 57 mg/perro.

- En un aspecto, la dosis de K9LO-133 administrada a un perro es de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 160 mg por metro cuadrado de área superficial del cuerpo. En una realización, la dosis de K9LO-133 administrada a un perro es de aproximadamente 130 mg a aproximadamente 170 mg por metro cuadrado de área superficial de cuerpo. En una realización, la dosis de K9LO-133 administrada a un perro es de aproximadamente 110 mg a aproximadamente 190 mg por metro cuadrado de área superficial de cuerpo. En una realización, la dosis de K9LO-133 administrada a un perro es de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 250 mg por metro cuadrado de área superficial de cuerpo.
- En un aspecto, la dosis de K9LO-133 administrada a un perro es de aproximadamente 50 mg/perro a aproximadamente 60 mg/perro. En otra realización, la dosis de K9LO-133 administrada a un perro es de aproximadamente 40 mg/perro a aproximadamente 70 mg/perro. En una realización, la dosis de K9LO-133 administrada a un perro es de aproximadamente 30 mg/perro a aproximadamente 100 mg/perro. En una realización, la dosis de K9LO-133 administrada a un perro es de aproximadamente 10 mg/perro a aproximadamente 1000 mg/perro.
- Se determinó la eficacia del K9LO-133 en perros administrándoles dosis intravenosas (IV) de aproximadamente 150 mg/m² en los Días 0, 7 y 35. Se aclimataron tres perras Beagle a las condiciones de estudio durante siete días, durante los cuales fueron sometidas a exámenes físicos; medida del peso corporal; y observaciones clínicas diarias. En los días de dosis, se administró a los perros 57 mg de K9LO-133 mediante infusión IV lenta con un caudal de 0,5 a 1 mL/min.
- Se tomaron muestras de sangre para la determinación de las proporciones de linfocitos y la retención de suero en los Días -5, 2, 9, 16, 23, 30 y 37.
- Tal como se muestra en la FIG. 1, se produjo una caída en la proporción de linfocitos B sanguíneos después del tratamiento con K9LO-133. La proporción de linfocitos B (CD21+ y CD22+) cayó en el Día 2, mostró una recuperación entre los Días 2 y 30, pero todavía no había vuelto a los niveles de línea base para el Día 37. Los linfocitos CD8+ mostraron una disminución en el Día 16 pero había retornado a los niveles de línea base para el Día 23. La proporción de linfocitos T CD4+ permaneció relativamente constante.
- Por tanto, la administración IV de K9LO-133 redujo el recuento de linfocitos B en circulación con una caída transitoria en los linfocitos T CD8+ en los perros tratados.
- En un aspecto, en la presente memoria se describe un anticuerpo que tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 12, y una región variable de cadena pesada (HCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 3. En una realización, el anticuerpo se une específicamente a CD20 canina.
- En otro aspecto, en la presente memoria se describe un anticuerpo que tiene una cadena ligera (LC) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 10, y una cadena pesada (HC) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 1. En una realización, el anticuerpo se une específicamente a CD20 canina.
- En un aspecto, en la presente memoria se describe un anticuerpo que tiene dos cadenas ligeras (LC), cada una con una secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEQ ID NO: 10, y dos cadenas pesadas (HC), cada una con una secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEQ ID NO: 1. En una realización, el anticuerpo se une específicamente a CD20 canina.
- En otro aspecto, se describe un método para tratar el linfoma en un paciente canino que incluye la administración a un paciente canino de cáncer de linfoma que necesite dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un anticuerpo que tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 12, y una región variable de cadena pesada (HCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 3, y el anticuerpo se une específicamente a CD20 canina. En una realización, el anticuerpo tiene una cadena ligera (LC) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 10, y una cadena pesada (HC) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 1. En una realización, el anticuerpo es K9LO-133.
- En un aspecto, se describe un kit que tiene una composición farmacéutica que contiene K9LO-133 con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- En otro aspecto, se describe un anticuerpo que tiene una cadena ligera (LC) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 10, y una cadena pesada (HC) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 1, y el anticuerpo se une específicamente a CD20 canina, y el anticuerpo se une a proteína A.

Ejemplos

K9LO-133

El K9LO-133 se puede suministrar en citrato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5 a 26,3 mg/mL. El vehículo puede ser suero fisiológico al 0,9% de NaCl.

- 5 La dosificación de K9LO-133 puede basarse en el área superficial del cuerpo, que para los perros de este estudio se estimó en 0,37 m². Cada perro recibió 150 mg/m² (57 mg) de K9LO-133 para cada dosis. Las dosis se prepararon tomando 57 mg (2,2 mL) de K9LO-133 y diluyendo en 27,8 mL de suero fisiológico hasta un volumen total de 30 mL para infusión.

Citometría de flujo

- 10 Las cantidades de linfocitos T (CD4+ y CD8+) y de linfocitos B (CD21+ y CD22+) pueden determinarse mediante citometría de flujo. La toma de muestras de sangre para la citometría de flujo se llevó a cabo antes de la alimentación. Se proporcionó aproximadamente 1 mL de sangre anti-coagulada con EDTA de 3 perros en la línea base (día -5), y en los Días 2, 9, 16, 23, 30 y 37. Los leucocitos se lisaron con tampón hipotónico de cloruro amónico y los leucocitos se tiñeron con anticuerpos reactivos con CD4, CD8, CD21 y CD22 caninas. A continuación, los anticuerpos no ligados fueron eliminados y se obtuvo la adquisición de 10.000 eventos de leucocito en un citómetro de flujo FACScan o FACSaria.
- 15

Muestras de linfoma

- 20 Diez muestras de linfoma canino congeladas fueron cortadas y embebidas en compuesto Tissue-Tek® OCT (Optimal Cutting Temperature) y almacenadas en un congelador fijado para mantener -80 °C hasta el seccionamiento. Se cortaron secciones de aproximadamente 5 µm para generar un número apropiado de portaobjetos, para posterior tinción IHC.

Tinción inmunohistoquímica

- 25 Se tiñeron secciones de cada muestra de linfoma usando AME-133V, un anticuerpo monoclonal de IgG1 humana dirigido contra CD20 humana, y K9LO-133, un anticuerpo monoclonal de isotipo C canino quimérico dirigido contra CD20, usando IHC como se detalla a continuación. El AME-133V estaba en una disolución de 19,5 mg/mL en salino tamponado con fosfato (PBS), pH 7,4. El K9LO-133 estaba en una disolución de 2,5 mg/mL en PBS, pH 7,4.

- 30 La tinción IHC se llevó a cabo incluyendo el uso de materiales de control positivo y negativo en cada experimento de tinción, y usando portaobjetos adicionales para el anticuerpo de control negativo y el ensayo de control, para asegurar la especificidad de la tinción. Los procedimientos de tinción, las diluciones de anticuerpo primario y secundario, y los controles para AME-133V se cualificaron en experimentos de tinción preliminares. Los procedimientos de tinción, las diluciones de anticuerpo primario y secundario, y los controles para K9LO-133 se cualificaron en un experimento de tinción de desarrollo de métodos.

Tinción de AME-133V

- 35 Se puede usar el procedimiento indirecto de inmunoperoxidasa para la tinción de tejido de linfoma canino con AME-133V para detectar CD20. Se fijaron los portaobjetos en acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente en el momento del seccionamiento. Las criosecciones fijadas en acetona fueron lavadas dos veces con salino tamponado con fosfato, NaCl 0,15 M, pH 7,2, PBS. A continuación, se paró la reacción de peroxidasa endógena mediante incubación de los portaobjetos con Biocare PeroxAbolish durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados entonces dos veces con PBS, incubados con la disolución de avidina durante 15 minutos, lavados una vez con PBS, incubados con la disolución de biotina durante 15 minutos, y lavados una vez con PBS. A continuación, los portaobjetos fueron tratados con un bloque de proteínas diseñado para reducir la unión no específica durante 20 minutos. El bloque de proteínas se preparó como se indica a continuación: PBS + 1% de albúmina de suero bovino (BSA); 0,5% de caseína; y 3% de suero de asno.
- 40

- 45 Después del bloque de proteínas, los anticuerpos primarios AME-133V, IgG1 humana, o ninguno, fueron aplicados a los portaobjetos en una concentración de 10 µg/mL durante 1 hora. A continuación, los portaobjetos fueron lavados dos veces con PBS, y el anticuerpo secundario biotinilado (IgG anti-humana de asno) fue aplicado a los portaobjetos durante 30 minutos. Los portaobjetos fueron lavados entonces dos veces con PBS, se hicieron reaccionar durante 30 minutos con el reactivo ABC Elite, y se lavaron dos veces con PBS. A continuación, se aplicó DAB durante 4 minutos como sustrato para la reacción de peroxidasa. Todos los portaobjetos fueron lavados con agua de grifo, contrateñidos, deshidratados y montados. Se utilizó PBS + 1% de BSA como diluyente para los anticuerpos primarios y reactivo ABC Elite. Se utilizó (PBS + 1% de BSA) + IgG canina (dilución 1:25) como diluyente para el anticuerpo secundario.
- 50

Tinción de K9LO-133

Se puede usar el procedimiento indirecto de inmunoperoxidasa para la tinción de tejido de linfoma canino con K9LO-133 para detectar CD20. Se puede eliminar el requisito de marcaje (p.ej., con biotina, peroxidasa o fluoresceína) de

- 5 K9LO-133 y la preclusión de la reactividad no específica entre la IgG anti-canina secundaria marcada y la IgG endógena de los tejidos examinados de acuerdo al siguiente proceso. Se permitió que el anticuerpo secundario marcado se uniera específicamente al anticuerpo primario no marcado (K9LO-133, DglgG, o ninguno) en una incubación de una noche de las mezclas de anticuerpos primarios/secundarios antes de la aplicación a las crio secciones de tejido. El reactivo de detección o el anticuerpo de control negativo (a una concentración de 10 µg/mL) se mezcló con IgG anti-perro de conejo biotinilada, anticuerpo específico de fragmento Fc (RbaDglgG) a una concentración de 15 µg/mL para obtener una relación de anticuerpo primario:secundario de 1:1,5 en el día previo a la tinción.
- 10 Se incubaron anticuerpo pre-complejados durante una noche en un mecanismo de balanceo en un frigorífico fijado para mantener 4 °C. Antes de usar el anticuerpo al día siguiente, se añadieron globulinas gamma de perro en cada vial para obtener una concentración final de 3 mg/mL, y a continuación se incubaron durante al menos 2 horas en el mecanismo de balanceo en un frigorífico fijado para mantener 4 °C. Los portaobjetos se fijaron en acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente en el momento del seccionamiento. En el día de la tinción, los portaobjetos fueron lavados dos veces con salino tamponado con Tris, NaCl 0,15 M, pH 7,6, TBS. A continuación, se detuvo la reacción
- 15 de peroxidasa endógena mediante incubación de los portaobjetos con un reactivo apropiado tal como el reactivo Biocare PeroxAbolish durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados entonces dos veces con TBS, se incubaron con la disolución de avidina durante 15 minutos, se lavaron una vez con TBS, se incubaron con la disolución de biotina durante 15 minutos, y se lavaron una vez con TBS. A continuación, los portaobjetos fueron tratados con un bloque de proteínas diseñado para reducir la unión no específica durante 20 minutos.
- 20 El bloque de proteínas se preparó de la siguiente manera: TBS + 1% de albúmina de suero bovina (BSA); 0,5% de caseína; y 3% de suero de conejo normal. Después del bloque de proteínas, los anticuerpos primarios y secundarios pre-complejados fueron aplicados sobre los portaobjetos durante dos horas. A continuación, los portaobjetos fueron lavados dos veces con TBS, tratados con el reactivo ABC Elite durante 30 minutos, lavados dos veces con TBS, y a continuación tratados con DAB durante 4 minutos como sustrato para la reacción de peroxidasa. Todos los portaobjetos fueron lavados con agua de grifo, contrateñidos, deshidratados y montados. Se utilizó TBS + 1% de BSA como diluyente para todos los anticuerpos y el reactivo ABC. Cada experimento de tinción incluyó un control positivo (leucocitos mononucleares), y un control negativo (miocitos lisos) de crio secciones de bazo canino.
- 25

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1; PRT; Secuencia Artificial

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLT
GDTSYNQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARSTYVGGDWQFDV
WGKGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSQSGSTVALACLVS GYIPEPVTVSWNSGSLT
SGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVPKRENG
RVPRPPDCPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPENPEVQISW

FVDSKQVQTANTQPREEQSNGTYRVVSVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPIE
EIISKTPGQAHQPNVYVLPSPRDEM SKNTVTLTCLVKDFFPPEIDVEWQSNQOQEPES
KYRMTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQISLSHSP
GK

5

SEQ ID NO: 2; ADN; Secuencia Artificial

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTG
AAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGCCGTACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGG
TGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGGCTATTTATCCCTTGA
CGGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTCGAAACTCCAGGTCACCATCTCAGCCG
ACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACA
CCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGACTTACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTCGA
TGCTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCACGGCCCC
CTCGGTTTTCCCGCTAGCGCCAGCTGTGGGTCCCAATCCGGCTCCACGGTGGCC
CTGGCCTGCCTGGTGTGACGGCTACATCCCCGAGCCTGTAACTGTGTCTGGAATT
CCGGCTCCTTGACCAGCGGTGTGCACACCTTCCCGTCCGTCTGCAGTCTCAGG
GCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACAGTGCCCTCCAGCAGGTGGCCCAGCGA
GACCTTCACCTGCAATGTGGCCCAACCGGCCACCAACACTAAAGTAGACAAGCC
AGTGCCCCAAAAGAGAAAAATGGAAGAGTTCCTCGCCACCTGATTGTCCCAAATG
CCCAGCCCCCTGAACTGCTGGGAGGGCCTTCGGTCTTCATCTTTCCCCCAAACCC
AAGGACACCCTCTTGATTGCCCGAACACCTGAGGTCACATGTGTGGTGGTGGATC
TGGACCCAGAAAACCCTGAGGTGCAGATCAGCTGGTTCGTGGATAGTAAGCAGG
TGCAAACAGCCAACACGCAGCCTCGTGAGGAGCAGTCCAATGGCACCTACCGTG
TGGTCAGTGTCTCCCCATTGGGCACCAGGACTGGCTTTCAGGGAAGCAGTTCAA
GTGCAAAGTCAACAACAAAGCCCTCCCATCCCCCATTGAGGAGATCATCTCCAA
GACCCAGGGCAGGCCCATCAGCCTAATGTGTATGTCTGCGCCCATCGCGGGA
TGAGATGAGCAAGAATACGGTCACCCTGACCTGTCTGGTCAAAGACTTCTTCCCA
CCTGAGATTGATGTGGAGTGGCAGAGCAATGGACAGCAGGAGCCTGAGAGCAA
GTACCGCATGACCCCGCCCCAGCTGGATGAAGATGGGTCTACTTCCTATACAGC
AAGCTCTCCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCGGGGAGACACCTTCATATGTGCG
GTGATGCATGAAGCTCTACACAACCACTACACACAGATATCCCTCTCCCATTCTC
CGGGTAAATGATGATAG

SEQ ID NO: 3; PRT; Secuencia Artificial

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLT
GDTSYNQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARSTYVGGDWQFDV
WGKGTTVTVSS

10

SEQ ID NO: 4; PRT; Secuencia Artificial

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISC

SEQ ID NO: 5; PRT; Secuencia Artificial

KGSGRTFTSYNMH

15

SEQ ID NO: 6; PRT; Secuencia Artificial

WVRQMPGKGLEWMG

SEQ ID NO: 7; PRT; Secuencia Artificial

AIYPLTGDTSYNQKSKL

20

SEQ ID NO: 8; PRT; Secuencia Artificial
QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC

5 **SEQ ID NO: 9; PRT; Secuencia Artificial**
ARSTYVGGDWQFDV

SEQ ID NO: 10; PRT; Secuencia Artificial

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASRSVPYIHWYQQKPGQAPRLLIYATSALASGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWLSNPPTFGQGTKLEIKRNDAAQPAVYLF
QPSPDQLHTGSASVYCLLSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLS
STLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

SEQ ID NO: 11; ADN; Secuencia Artificial

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCCGGAGTGTACCGTACATCCACTGGTACCAGC
AGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACATCCGCTCTGGCTTC
TGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC
CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTGGCTG
AGTAACCCACCCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAAATGAT
GCCCAGCCAGCCGTCTATTTGTTCCAACCATCTCCAGACCAGTTACACACAGGAA
GTGCCTCTGTTGTGTGCTTGTGAATAGCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAA
GTGGAAAGTGGATGGTGTTCATCCAAGACACAGGCATCCAGGAAAGTGTACAGA
10 GCAGGACAAGGACAGTACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGATGTCCAGTAC
TGAGTACCTAAGTCATGAGTTGTACTCCTGTGAGATCACTCACAAGAGCCTGCCC
TCCACCCTCATCAAGAGCTTCCAAAGGAGCGAGTGTGAGAGAGTGGAC

SEQ ID NO: 12; PRT; Secuencia Artificial

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASRSVPYIHWYQQKPGQAPRLLIYATSALASGIPD
15 RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWLSNPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 13; PRT; Secuencia Artificial
EIVLTQSPGTLSPGERATLSC

20 **SEQ ID NO: 14; PRT; Secuencia Artificial**
RASRSVPYIH

SEQ ID NO: 15; PRT; Secuencia Artificial
WYQQKPGQAPRLI

25 **SEQ ID NO: 16; PRT; Secuencia Artificial**
YATSALAS

SEQ ID NO: 17; PRT; Secuencia Artificial
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC

30 **SEQ ID NO: 18; PRT; Secuencia Artificial**
QQWLSNPPT

35 **SEQ ID NO: 19; PRT; Secuencia Artificial**
FGQGTKLEIK

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

5 <120> Anticuerpo anti-CD20 canina

<130> P20914

<160> 19

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 456

15 <212> PRT

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 1

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser
50 55 60

Lys Leu Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Gln Ser Gly Ser Thr Val
130 135 140

Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

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

20

ES 2 868 650 T3

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala His
 195 200 205
 Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn
 210 215 220
 Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Leu Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser
 275 280 285
 Lys Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Asn
 290 295 300
 Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ser Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln
 340 345 350
 Pro Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn
 355 360 365
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile
 370 375 380
 Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr
 385 390 395 400
 Arg Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe
 420 425 430
 Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile
 435 440 445
 Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

5 <210> 2
 <211> 1377
 <212> ADN

ES 2 868 650 T3

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 2

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
tcctgtaagg gttctggccg tacatttacc agttacaata tgcaactgggt gcgccagatg	120
cccgggaaag gcctggagtg gatgggggct atttatccct tgacgggtga tacttcctac	180
aatcagaagt cgaaactcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
ctgcagtggg gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagatcgact	300
tacgtgggag gtgactggca gttcagatgc tggggcaagg ggaccacggt caccgtctcc	360
tcagcctcca ccacggcccc ctcggttttc ccgctagcgc ccagctgtgg gtcccaatcc	420
ggctccacgg tggccctggc ctgcctgggtg tcaggctaca tccccgagcc tgtaactgtg	480
tcctggaatt ccggctcctt gaccagcggg gtgcacacct tcccgtccgt cctgcagtcc	540
tcagggtctt actccctcag cagcatgggtg acagtgcctt ccagcaggtg gccagcagag	600
accttcacct gcaatgtggc ccacccggcc accaactacta aagtagacaa gccagtgcc	660
aaaagagaaa atggaagagt tcctcgcccc cctgattgtc ccaaagtcgc agccctgaa	720
ctgctgggag ggccttcggg cttcatcttt cccccaaaac ccaaggacac cctcttgatt	780
gcccgaacac ctgaggtcac atgtgtgggtg gtggatctgg acccagaaaa ccctgaggtg	840
cagatcagct ggttcgtgga tagtaagcag gtgcaaacag ccaacacgca gcctcgtgag	900
gagcagtcca atggcaccta ccgtgtggtc agtgtcctcc ccattgggca ccaggactgg	960
ctttcagggg agcagttcaa gtgcaaagtc aacaacaaag ccctcccatc cccattgag	1020
gagatcatct ccaagacccc agggcaggcc catcagccta atgtgtatgt cctgccgcca	1080
tcgctgggatg agatgagcaa gaatacggtc accctgacct gtctgggtcaa agacttcttc	1140
ccacctgaga ttgatgtgga gtggcagagc aatggacagc aggagcctga gagcaagtac	1200
cgcatgaccc cgccccagct ggatgaagat gggctcctact tcctatacag caagctctcc	1260
gtggacaaga gccgctggca gcggggagac accttcatat gtgcggtgat gcatgaagct	1320
ctacacaacc actacacaca gatatccctc tcccattctc cgggtaaatg atgatag	1377

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 3

ES 2 868 650 T3

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser
50 55 60

Lys Leu Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 4

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys
20

10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

15

<400> 5

Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
1 5 10

<210> 6

20

<211> 14

<212> PRT

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 6

Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

25

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

30

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 7

ES 2 868 650 T3

Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser Lys
1 5 10 15

Leu

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 8

Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
20 25 30

10 <210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

15 <400> 9

Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val
1 5 10

<210> 10

<211> 216

20 <212> PRT

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 10

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

25

ES 2 868 650 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Val Pro Tyr Ile
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Ala Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Leu Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Asn Asp Ala Gln Pro
 100 105 110
 Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp Gln Leu His Thr Gly Ser
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
 130 135 140
 Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln Asp Thr Gly Ile Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 165 170 175
 Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser His Glu Leu Tyr Ser Cys
 180 185 190
 Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr Leu Ile Lys Ser Phe Gln
 195 200 205
 Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
 210 215

<210> 11

<211> 648

<212> ADN

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 11

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagccg gagtgtaccg tacatccact ggtaccagca gaaacctggc 120

ES 2 868 650 T3

caggctccca ggctcctcat ctatgccaca tccgctctgg cttctggcat cccagacagg 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagact ggagcctgaa 240
 gattttgcag tgtattactg tcagcagtgg ctgagtaacc caccacttt tggccagggg 300
 accaagctgg agatcaaacg aaatgatgcc cagccagccg tctatttggt ccaaccatct 360
 ccagaccagt tacacacagg aagtgcctct gttgtgtgct tgctgaatag cttctacccc 420
 aaagacatca atgtcaagtg gaaagtggat ggtgtcatcc aagacacagg catccaggaa 480
 agtgtcacag agcaggacaa ggacagtacc tacagcctca gcagcaccct gacgatgtcc 540
 agtactgagt acctaagtca tgagttgtac tcctgtgaga tcactcacia gagcctgccc 600
 tccaccctca tcaagagctt ccaaaggagc gagtgtcaga gagtggac 648

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 12

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 Arg Ser Val Pro Tyr Ile
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Ala Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Leu Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 13

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
 20

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 14

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

<210> 15
<211> 14
5 <212> PRT
<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 15
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10

10 <210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

15 <400> 16
Tyr Ala Thr Ser Ala Leu Ala Ser
1 5

20 <210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 17
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

25 Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

<400> 18
Gln Gln Trp Leu Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

35 <210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Anticuerpo quimérico anti-CD20 de ser humano/perro

40 <400> 19
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente a CD20 canina, que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 12, y una región variable de cadena pesada (HCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 3, para su uso en el tratamiento de linfoma en un paciente canino.
2. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 10, y una cadena pesada (HC) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEQ ID NO: 1.
3. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras (LC), teniendo, cada una, una secuencia de aminoácidos que se proporciona en la SEQ ID NO: 10, y dos cadenas pesadas (HC), teniendo, cada una, una secuencia de aminoácidos que se proporciona en la SEQ ID NO: 1.
4. El anticuerpo para su uso según cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo se une específicamente a CD20 canina, y en donde el anticuerpo se une a proteína A.

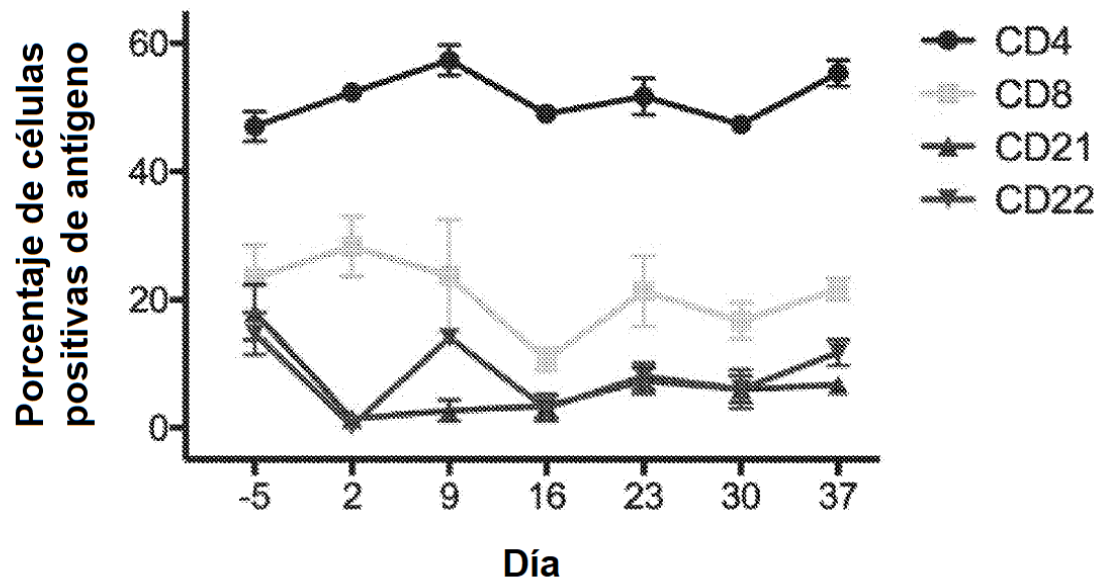


FIG. 1