



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 664**

51 Int. Cl.:
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02769304 .3**
96 Fecha de presentación : **03.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1383785**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2004**

54 Título: **Anticuerpo recombinante para tumor específico y su utilización.**

30 Prioridad: **03.05.2001 US 288564 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2011

73 Titular/es: **Merck Patent GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es: **Gillies, Stephen, D.;**
Lo, Kin-Ming y
Qian, Xiuqi

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 361 664 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 recombinante para tumor específico y su utilización

Campo de la invención

5 La presente invención hace referencia en general a los anticuerpos recombinantes. Más específicamente, la invención hace referencia a anticuerpos recombinantes que específicamente se unen a la molécula de adhesión celular epitelial humana, y a su utilización como agentes de diagnóstico, prognosis y terapéuticos.

Antecedentes de la invención

10 Ha habido un progreso significativo en el desarrollo de terapias basadas en anticuerpos a lo largo de los años. Por ejemplo, los investigadores han identificado no sólo una variedad de marcadores específicos de cáncer, sino también un variedad de anticuerpos que se unen específicamente a dichos marcadores. Los anticuerpos pueden utilizarse para distribuir ciertas moléculas, por ejemplo, una toxina o una fracción inmunoestimulante, por ejemplo, una citoquina, a una célula cancerígena que expresa el marcador para destruir en forma selectiva la célula cancerígena (véase, por ejemplo las Patentes estadounidenses N° 5541087 y 5650150).

15 El anticuerpo KS-1/4 es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la Molécula de Adhesión Celular Epitelial (MAC Epitelial, del inglés EpCAM) La MAC epitelial se expresa a niveles muy bajos en la superficie apical de ciertas células epiteliales. Por ejemplo, la MAC epitelial se expresa en células intestinales en la superficie celular enfrentada a los alimentos ingeridos y lejos de la circulación, donde no sería accesible para la mayoría de las proteínas y células del sistema inmunológico (Balzar et al. [1999] J. Mol. Med. 77: 699-712).

20 EP 0338 767 (Beavers et al.) revela diferentes versiones de anticuerpos KS 1/4 quiméricos y murinos. Beiboer et al. (J. Mol. Biol, (2000) 296, 833-849) revela un anticuerpo humano dirigido a una MAC epitelial obtenido mediante la técnica de expresión en fago llamada "phage display" utilizando "selección guiada" para mejorar la afinidad.

25 Sin embargo, en ciertas circunstancias, la MAC epitelial se expresa en un alto grado en ciertas células, por ejemplo, células tumorales de origen epitelial. Normalmente, estas células tumorales han perdido su polaridad; como consecuencia, la MAC epitelial se expresa sobre toda la superficie de la célula. De este modo, la MAC epitelial es un conveniente marcador tumoral específico para dirigir fracciones inmunoestimulantes basadas en anticuerpos a células tumorales (Simon et al. [1990] Actas de la Academia Nacional de Ciencia de EEUU. 78:2755-2759; Perez et al. [1989] J Immunol. 142:3662-3667).

30 Sin embargo, los anticuerpos pueden tener una inmunogenicidad asociada en el mamífero huésped. Es más probable que esto ocurra cuando los anticuerpos no son autoanticuerpos. En consecuencia, la efectividad de las terapias basadas en anticuerpos a menudo es por una respuesta inmunogénica dirigida contra el anticuerpo. La respuesta inmunogénica normalmente se incrementa cuando el anticuerpo es en su totalidad o en parte derivado de un mamífero distinto del mamífero huésped, por ejemplo, cuando el anticuerpo es derivado de ratón y el receptor es un ser humano. Por consiguiente, puede ser útil modificar los anticuerpos derivados de ratón para ser más similares a los anticuerpos humanos, con el propósito de reducir o minimizar la inmunogenicidad del anticuerpo derivado de ratón.

35 Si bien se ha desarrollado una variedad de enfoques, incluyendo, por ejemplo, los anticuerpos quiméricos, la humanización de anticuerpos y modificación superficial (veneering), en consecuencia, existe una necesidad en el arte de anticuerpos que se unan a marcadores de cáncer específicos y que tengan inmunogenicidad reducida al ser administrados a humanos. Además, existe una necesidad en el arte de anticuerpos que distribuyan toxinas o fracciones inmunoestimulantes, por ejemplo, como las proteínas de fusión o los inmunoconjugados a un marcador de cáncer específico para destruir la célula tumoral en forma selectiva.

Resumen de la invención

45 La presente invención se basa en parte en la identificación de un anticuerpo recombinante que se une específicamente a la MAC epitelial humana, pero es menos inmunogénico en humanos que el anticuerpo anti-MAC epitelial del modelo murino. En particular, la invención hace referencia con una proteína de fusión inmunocitoquina que comprende dicho anticuerpo como se indicó el cual se fusiona con una molécula IL2. De este modo, en particular, la invención proporciona un anticuerpo KS recombinante con una cadena ligera con región variable modificada como específica SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada con región variable modificada como específica SEQ ID NO: 18, y una proteína de fusión recombinante KS – IL2 que tiene una cadena ligera como específica SEQ ID NO: 42 y una cadena pesada como específica SEQ ID NO: 41.

50 Como se utilizan en la presente invención, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" hacen referencia a (i) un anticuerpo intacto (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal), (ii) regiones de unión al

antígeno de éste, que incluyen, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento, un fragmento Fab', un fragmento (Fab')₂, un fragmento Fv, un sitio de unión al anticuerpo de cadena sencilla, un sFv, (iii) anticuerpos biespecíficos y regiones de unión al antígeno de éstos, y (iv) anticuerpos multiespecíficos y regiones de unión al antígeno de éstos.

5 Como se utilizan en la presente invención, los términos “unir específicamente”, “une(n) específicamente” y “unión específica” significan que el anticuerpo tiene una afinidad de unión hacia un antígeno en particular de al menos aproximadamente 10^6 M^{-1} , más preferentemente de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , mas preferentemente aún de al menos aproximadamente 10^8 M^{-1} , y más preferentemente de al menos aproximadamente 10^{10} M^{-1} .

10 Como se utilizan en la presente invención, los términos “Regiones Determinantes de Complementariedad” y “región/regiones CDR” significan las regiones de hipervariabilidad o curvas de regiones variables de inmunoglobulina que interactúan principalmente con un antígeno. La región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) y la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), ambas contienen tres regiones CDR interpuestas entre las regiones variables (regiones FW), como se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, con referencia a la secuencia de aminoácidos que define la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina del anticuerpo KS-1/4 como se muestra en SEQ ID NO: 1, las regiones CDR se definen por las secuencias de aminoácidos desde Ser24 hasta Leu33 (región CDR1), de Asp49 a Ser55 (región CDR2), y de His88 a Thr96 (región CDR3). Con referencia a la secuencia de aminoácidos que define la variable de la cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo KS-1/4 como se muestra en SEQ ID NO: 2, las regiones CDR se definen por las secuencias de aminoácidos desde Gly24 hasta Asn35 (región CDR1), de Trp50 a Gly66 (región CDR2), y de Phe99 a Tyr105 (región CDR3). Las correspondientes regiones CDR de los otros anticuerpos descritos en la presente invención se muestran en las Figuras 1A-1C después de alinearse con la correspondiente secuencia de cadena pesada o ligera del KS-1/4.

25 Como se utilizan en la presente invención, los términos “Regiones Variables” y “Regiones FW” significan las regiones de una región variable de inmunoglobulina adyacente a las Regiones Determinantes de Complementariedad. Tanto la región variable (V_H) de la cadena pesada de inmunoglobulina como la región variable de la cadena ligera (V_L) de inmunoglobulina contienen cuatro regiones FW, como se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, con referencia a la secuencia de aminoácidos que define la variable de la cadena ligera de inmunoglobulina del anticuerpo KS-1/4 como se muestra en SEQ ID NO: 1, las regiones FW se definen por las secuencias de aminoácidos desde Gln1 hasta Cys23 (región FW1), de Trp34 a Phe 48 (región FW2), de Gly56 a Cys87 (región FW3), y de Phe97 a Lys106 (región FW4). Con referencia a la secuencia de aminoácidos que define la variable de la cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo KS-1/4 como se muestra en SEQ ID NO: 2, las regiones FW se definen por las secuencias de aminoácidos de Gln1 a Ser25 (región FW1), de Trp36 a Gly49 (región FW2), de Arg67 a Arg98 (región FW3), y desde Trp106 hasta Ser116 (región FW4). Las regiones FW de los otros anticuerpos descritos en la presente invención se muestran en las Figuras X e Y después de alinearse con la correspondiente secuencia de la cadena pesada o ligera del KS-1/4.

35 Como se utiliza en la presente invención, el término “anticuerpo KS” significa un anticuerpo que se une específicamente al mismo antígeno MAC epitelial humano enlazado por el anticuerpo murino KS-1/4 expresado por un hibridoma (véase, por ejemplo, Res. Cáncer 1984, 44 ((2):681-7). El anticuerpo KS comprende preferentemente (i) una secuencia de aminoácidos de SASSSVSY (aminoácidos 24-31 de SEQ ID NO: 1) que define al menos una porción de una secuencia de la región CDR1 de cadena ligera de inmunoglobulina, (ii) una secuencia de aminoácidos de DTSNLS (aminoácidos 49-55 de SEQ ID NO: 1) que define al menos una porción de una secuencia de la región CDR2 de cadena ligera de inmunoglobulina, (iii) una secuencia de aminoácidos de HQRSGYPYT (aminoácidos 88-96 de SEQ ID NO: 1) que define al menos una porción de una secuencia de la región CDR3 de cadena ligera de inmunoglobulina, (iv) una secuencia de aminoácidos de GYTFTNYGMN (aminoácidos 26-35 de SEQ ID NO: 2) que define al menos una porción de una secuencia de la región CDR1 de cadena pesada de inmunoglobulina, (v) una secuencia de aminoácidos de WINTYTGEPTYAD (aminoácidos 50-62 de SEQ ID NO: 2) que define al menos una porción de una secuencia de la región CDR2 de cadena pesada de inmunoglobulina, o (vi) una secuencia de aminoácidos de SKGDY (aminoácidos 101-105 de SEQ ID NO: 2) que define al menos una porción de una secuencia de la región CDR3 de cadena pesada de inmunoglobulina, o cualquier combinación de las anteriores.

50 En otra realización, el dominio V_L de la inmunoglobulina comprende una secuencia de región FW1 seleccionada del grupo que consiste en: (i) residuos de aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO: 9; y (ii) residuos de aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO: 8. En otra realización, los dominios V_H de la inmunoglobulina comprenden una secuencia de región FW definida por los residuos de aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO: 18 y/o una secuencia de región FW definida por los residuos de aminoácidos 67-98 de SEQ ID NO: 18. Más preferentemente, el dominio V_L comprende una secuencia de aminoácidos definida por los aminoácidos 1-106 de SEQ ID NO: 9 y/o el dominio V_H comprende una secuencia de aminoácidos definida por los aminoácidos 1-116 de SEQ ID NO: 18.

Además, el anticuerpo puede incluir opcionalmente una secuencia de aminoácidos que define al menos una porción de una secuencia de una región CDR que incluye por ejemplo, (i) residuos de aminoácidos 24-31 de SEQ ID NO: 1; (ii) residuos de aminoácidos 49-55 de SEQ ID NO: 1; y/o residuos de aminoácidos 88-96 de SEQ ID NO: 1. De

manera similar, el anticuerpo puede incluir opcionalmente una secuencia de aminoácidos que define al menos una porción de una secuencia de una región CDR que incluye por ejemplo, (i) residuos de aminoácidos 26-35 de SEQ ID NO: 2; (ii) residuos de aminoácidos 50-62 de SEQ ID NO: 2; y/o residuos de aminoácidos 101-105 de SEQ ID NO: 2.

- 5 En otra realización, el anticuerpo comprende la porción dirigida al antígeno de una proteína de fusión de anticuerpo-citoquina. La citoquina es una interleucina y más preferentemente es interleucina-2. Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de esta proteína de fusión se representan en SEQ ID NOs 41 y 42.

Descripción de los dibujos

- 10 Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran una alineación de variantes de cadena pesada y ligera y secuencias de consenso de anticuerpos KS. Las Regiones Variables de Inmunoglobulina (Región FW-Región FW4) se indican con un -. Las "Regiones Determinantes de Complementariedad" de inmunoglobulina (región CDR1- región CDR3) se indican con un *. Los segmentos de la región V de la cadena ligera del anticuerpo individual KS se indican como "VK", donde K hace referencia al hecho de que la cadena ligera es una cadena kappa. Los segmentos de la región V de la cadena pesada del anticuerpo individual KS se indican como "V_H". Los aminoácidos sustituibles se indican con una "X" en las secuencias de consenso.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo recombinante que une específicamente la Molécula de Adhesión Celular Epitelial humana (MAC Epitelial). Los anticuerpos preferentes de la invención tienen regiones variables alteradas que producen como resultado una inmunogenicidad reducida en los seres humanos.

- 20 El anticuerpo preferente de la invención tiene regiones variables alteradas que producen como resultado una inmunogenicidad reducida en los seres humanos, y se fusiona con JL-2.

Las regiones variables del anticuerpo de la invención son particularmente útiles para dirigir anticuerpos y proteínas de fusión de un anticuerpo a tejidos tumorales que sobre-expresan la MAC epitelial en pacientes humanos.

Secuencias de proteína de la invención

- 25 La presente invención revela una familia de secuencias de región variable o región V de anticuerpo que, cuando se heterodimerizan apropiadamente, se unen a la molécula de adhesión celular epitelial (MAC Epitelial) también conocida como antígeno KS o KSA. Las proteínas preferentes de la invención son útiles para el tratamiento de pacientes humanos como se describe en la presente invención. Por lo tanto, las variantes preferentes del anticuerpo KS son humanizadas, desinmunizadas, o ambas, para reducir su inmunogenicidad cuando se administran a un humano. De acuerdo con la invención, los anticuerpos murinos KS pueden ser desinmunizados o humanizados, por ejemplo, mediante la utilización de métodos de desinmunización en los que epítomos potenciales de las células T son eliminados o debilitados mediante la introducción de mutaciones que reducen la unión de un epítomo de péptido a una molécula MHC clase II (véase, por ejemplo, WO98/52976 y WO00/34317), o mediante la utilización de métodos en los que epítomos no humanos de células T son mutados para que correspondan con auto-epítomos humanos presentes en anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N° 5712120).

- 35 El anticuerpo recombinante anti-MAC Epitelial, de acuerdo con la invención tiene una secuencia de cadena ligera de región variable de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 9.

El anticuerpo recombinante anti MAC-Epitelial, de acuerdo con la invención tiene una secuencia de cadena pesada de región variable de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 18.

- 40 La presente invención también revela métodos para realizar ensayos de la expresión de anticuerpos KS de células tales como células de mamíferos, células de insectos, células de levadura, otras células eucariotas o procariotas (véase el Ejemplo 1). En un método preferente, las regiones V del anticuerpo KS se expresan como componentes de un anticuerpo humano intacto, y la expresión del anticuerpo de una línea celular eucariota sometido a ensayo mediante una ELISA que detecta la región Fc humana. Para cuantificar en forma precisa la unión de un anticuerpo KS a una MAC Epitelial, puede utilizarse un ensayo Biacore.

- 45 Tratamiento de enfermedades humanas con proteínas de fusión de un anticuerpo KS

La presente invención también revela las secuencias de proteínas de fusión de anticuerpo KS-IL2 que son útiles en el tratamiento de enfermedades humanas, tales como el cáncer. Determinadas proteínas de fusión del anticuerpo KS-IL2 (véase, por ejemplo, el Constructo 3 en el Ejemplo X), pueden ser utilizadas para el tratamiento de pacientes humanos con cáncer, con una sorprendente respuesta inmune baja contra el anticuerpo.

Se ha descubierto que durante el tratamiento de cáncer humano con KS-1/4(VH2/VK1)-IL2 se encontró aún menos inmunogenicidad que con KS-1/4(Constructo 3)-IL2. Específicamente, durante una prueba clínica, los pacientes con anticuerpos anti-idiotípicos y anticuerpos dirigidos contra la unión anticuerpo-IL2 o contra la fracción IL2 se vieron a una frecuencia aún menor que con KS-1/4(Constructo 3)-IL2.

5 Ejemplos

Ejemplo 1. Métodos y reactivos para la expresión de anticuerpos KS y análisis de su actividad de unión al antígeno

1 A. Cultivo celular y transfección

10 Las siguientes técnicas generales se utilizaron en los ejemplos siguientes. Para la transfección transitoria, se introdujo ADN plásmido en 293 células de riñón humano por coprecipitación de ADN plásmido con fosfato de calcio [Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación molecular: Un manual de laboratorio), Cold Spring Harbor, NY].

15 A fin de obtener clones establemente transfectados, se introdujo ADN plásmido en las células de mieloma NS/0 de ratón por electroporación. Se cultivaron células NS/0 en el medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se lavaron aproximadamente 5×10^6 células una vez con tampón fosfato salino (PBS) y se colocaron nuevamente en suspensión en 0,5ml de PBS. Después se encubaron diez μg de ADN plásmido linearizado con las células en una cubeta Gene Pulser (0,4cm de distancia entre electrodos, BioRad) durante 10 minutos en hielo. La electroporación se realizó utilizando un Gene Pulser (BioRad) con ajustes de 0,25 V y $500\mu\text{F}$. Se permitió que las células se recuperaran durante diez minutos en hielo, después de lo cual se colocaron nuevamente en suspensión en el medio de cultivo y después se colocaron en dos placas de 96 pocillos. Los clones transfectados de forma estable fueron seleccionados por crecimiento en presencia de 100nM de metotrexato (MTX), que se introdujo 20 dos días post-transfección. Las células se alimentaron cada 3 días dos a tres veces más, y los clones resistentes a la MTX aparecieron en de 2 a 3 semanas. Los sobrenadantes de clones se analizaron mediante el ensayo ELISA Fc antihumano para identificar los grandes productores [Gillies et al. (1989) J. Immunol. Methods 125:191]. Los clones de gran producción se aislaron y propagaron en un medio de cultivo que contenía 100nM de MTX.

1B. ELISA

30 Se utilizaron tres diferentes ensayos ELISA para determinar las concentraciones de productos proteicos en los sobrenadantes de clones resistentes a MTX y otras muestras de prueba. El ensayo ELISA anti-huFc se utilizó para medir la cantidad de regiones humanas Fc que contenían proteínas, tales como anticuerpos quiméricos. El ELISA anti-hu kappa se utilizó para medir la cantidad de cadena ligera kappa (de inmunoglobulinas quiméricas o humanas). El ELISA anti-muFc se utilizó para medir la cantidad de proteínas que contenían muFc en las muestras de prueba (véase el Ejemplo 1C más adelante).

El ELISA anti-huFc se describe en detalle más adelante.

A. Placas recubiertas

35 Se recubrieron las placas ELISA con AffiniPure de cabra anti-humano IgG (H+L) (Jackson Immuno Research) a $5\mu\text{g/ml}$ en PBS, y $100\mu\text{l/pocillo}$ en placas de 96 pocillos (placa Nunc-Immuno Maxisorp). Las placas recubiertas se taparon e incubaron a 4°C durante la noche. Después, se lavaron las placas 4 veces con 0.05% Tween (Tween 20) en PBS, y se bloquearon con 1% de seroalbúmina bovina (BSA)/1% suero de cabra en PBS, $200\mu\text{l/pocillo}$. Después de la incubación con tampón de bloqueo a 37°C durante 2 horas, se lavaron las placas 4 veces con 0,05% Tween en PBS 40 y se secaron en toallas de papel.

B. Incubación con muestras de prueba y anticuerpo secundario

45 Se diluyeron las muestras de prueba a las concentraciones apropiadas en el tampón de muestra, que contenía 1% de seroalbúmina bovina (BSA)/1% suero de cabra/0,05% Tween en PBS. Se preparó una curva estándar con un anticuerpo quimérico (con una región humana Fc), cuya concentración se conocía. Para preparar una curva estándar, se hacen diluciones seriadas en el tampón de muestras para lograr una curva estándar entre 125ng/ml y $3,9\text{ng/ml}$. Se agregaron a la placa las muestras y los estándares diluidos, $100\mu\text{l/pocillo}$, y la placa se incubó a 37°C durante 2 horas.

50 Después de la incubación, se lavó la placa 8 veces con 0,05% Tween en PBS. A cada pocillo después se le agregó $100\mu\text{l}$ del anticuerpo secundario, la peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugado anti-humano IgG (Jackson Immuno Research), diluido aproximadamente 1:120.000 en el tampón de muestras. La dilución exacta del anticuerpo

secundario debió determinarse para cada lote del conjugado anti-humano IgG de peroxidasa de rábano picante. Después de la incubación a 37°C durante 2 horas, se lavó la placa 8 veces con 0,05% Tween en PBS.

C. Revelado

5 La solución de sustrato se agregó a la placa a 100µl/pocillo. Se preparó la solución de sustrato disolviendo 30mg de o-fenilenediamina dihidrocloruro (OPD) (1 tableta) en 15ml de 0,025M de ácido cítrico/0,05M Na₂HPO₄ tampón, pH 5, que contenía 0,03% de H₂O₂ recién agregado. Se permitió que el color se revelara durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El tiempo de desarrollo estuvo sujeto a cambios, dependiendo de la variabilidad de las placas recubiertas de lote a lote, del anticuerpo secundario, etc. Se observó el revelado del color en la curva estándar para determinar cuándo detener la reacción. La reacción se detuvo adhiriendo 4NH₂SO₄, 100µl/pocillo. Un lector de placa leyó la placa, que se fijó a 490nm y 650nm y se programó para sustraer la densidad óptica (DO) de fondo en 650nm de la DO en 490nm.

El ELISA anti-hu kappa siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, excepto en que el anticuerpo secundario utilizado fue conjugado de cabra anti-hu kappa con peroxidasa de rábano picante (Southern Biotechnology Assoc. Inc., Birmingham, AL), utilizado en una dilución 1:4000.

15 El procedimiento para el ELISA anti-muFc también fue similar, excepto en que las placas ELISA se recubrieron con AffiniPure de cabra anti-murino IgG (H+L) (Jackson Immuno Research) a 5µg/ml en PBS, y 100µl/pocillo; y el anticuerpo secundario fue conjugado de cabra anti-mulgG, Fcγ (Jackson Immuno Research) con peroxidasa de rábano picante, utilizado en una dilución 1:5000.

1C. Clonación del antígeno KS (KSA, MAC epitelial) y expresión de la forma soluble como MAC epitelial humana -Fc murina

20 Se preparó el ARN mensajero (ARNm) de las células LnCAP utilizando el Dynabeads mRNA Direct Kit (DynaL, Inc., Lake Success, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la síntesis de la primera cadena de ADN complementario (ADNc) con oligo (dT) y la transcriptasa inversa, el total de la composición del ADNc que codifica la molécula de adhesión celular epitelial (también conocido como antígeno KS o KSA), fue clonado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de cebadores de PCR se basaron en la secuencia publicada descrita en Perez y Walker (1989) J. Immunol. 142:3662-3667. La secuencia del cebador homosenido es **TCTAGAG-CAGCATGCGCCCCCGCA** (SEQ ID NO: 27), y la secuencia del cebador antisentido es **CTCGAGTTATGCATT-GAGTTCCT** (SEQ ID NO: 28), donde la traducción del codón de iniciación y del anti-codón del codón de terminación de traducción se indican con negrita, y los sitios de restricción XbaI (TCTAGA) y XhoI (CTCGAG) están subrayados.

30 El producto de reacción en cadena de la polimerasa fue clonado y la secuencia correcta KSA fue confirmada mediante la secuenciación de varios clones independientes. La secuencia de ADNc de la KSA de LnCAP fue esencialmente idéntica a la secuencia publicada de KSA de células UCLA-P3 (Perez and Walker, 1989). Sin embargo, en el residuo de aminoácido número 115, la secuencia de nucleótidos de LnCAP fue ATG en lugar de ACG (Met en lugar de Thr), y en el residuo de aminoácido número 227, la secuencia de nucleótidos de LnCAP fue ATA en lugar de ATG (Ile en lugar de Met).

La unión del anticuerpo KS-1/4 al KSA recombinante se demostró por inmunotinción. La expresión superficial de KSA se obtuvo al transfectar células, por ejemplo, CT26, B16, etc., con KSA completo en un vector de expresión de mamíferos apropiado (pdCs, como se describió en patente estadounidense N° 5541087), seguido de inmunotinción con el anticuerpo KS-1/4. Para la expresión de KSA como un antígeno soluble, se borró la porción del ADNc que codifica el dominio transmembrana del KSA. Para facilitar la expresión, detección y purificación, se expresó el KSA soluble como un KSA-muFc, la construcción del mismo se describe a continuación. El fragmento de restricción 780 bp XbaI-EcoRI que codifica el KSA soluble se ligó al fragmento AflII-XhoI que codifica el muFc (patente estadounidense N° 5726044) por medio de un linker-adaptor (adaptador de conector):

5' AA TTC TCA ATG CAG GGC 3' (SEQ ID NO: 29)

3' G AGT TAC GTC CCG AAT T 5' (SEQ ID NO: 30)

El fragmento XbaI-XhoI que codifica el KSA-muFc soluble fue ligado al vector pdCs. El vector de expresión resultante, pdCs-KSA-muFc, se utilizó para transfectar células y por medio del ELISA anti-muFc se identificaron clones estables que expresaban KSA-muFc.

1D. Medición de la unión al antígeno

50 El KSA-muFc en medio condicionado se purificó primero por la cromatografía de Proteína A de acuerdo con el protocolo del proveedor (Repligen, Cambridge, MA). El KSA-muFc purificado fue utilizado para recubrir placas de 96-pocillos

(placa Nunc-Immuno, Maxisorp) a 5µg/ml en PBS, y 100µl/pocillo. El ensayo fue similar al procedimiento ELISA descrito en el Ejemplo 1B. Las placas recubiertas fueron tapadas e incubadas a 4°C durante la noche. Después, las placas se lavaron y bloquearon. Se diluyeron las muestras de prueba a las concentraciones apropiadas en el buffer de muestra, agregadas a la placa a 100µl/pocillo, y se incubó la placa a 37°C durante una hora. Después de la incubación, se lavó la placa 8 veces con 0,05% Tween en PBS. A cada pocillo después se agregaron 100µl del anticuerpo secundario, conjugado anti-humano IgG (Jackson Immuno Research) con peroxidasa de rábano picante, se diluyó a aproximadamente 1:120000 en el tampón de muestras. La placa después se desarrolló y se leyó de acuerdo con lo descrito en Ejemplo 1B.

10 1E. Medición de las constantes de disociación y de afinidad de los anticuerpos KS-1/4 de la MAC epitelial utilizando un ensayo Biacore

15 Se midió la afinidad de las moléculas de KS-1/4 y KS-IL2 con el antígeno MAC epitelial por medio del análisis de resonancia de plasmones superficiales de la interacción anticuerpo-antígeno, utilizando una máquina Biacore (Biacore International AB, Uppsala, Suecia). Se combinó MAC epitelial-Fc murino con un chip sensor CM5 utilizando un protocolo de acoplamiento amino provisto por el fabricante. Después se pasaron por el chip los KS-1/4 y KS-IL2 en concentraciones que oscilaban entre los 25nm y 200nm donde se observó la unión con el chip. Utilizando las rutinas incorporadas de ajuste de curvas del software Bitacore, se calcularon las constantes de afinidad y disociación.

20 1F. Medición de las afinidades de unión de los anticuerpos KS-1/4 utilizando líneas celulares que expresan MAC epitelial

Los anticuerpos purificados KS-1/4 fueron ionizados con ¹²⁵I utilizando técnicas estándares, y se incubaron concentraciones en aumento de la proteína etiquetada con la línea celular PC-3 de MAC epitelial positivo. Se generaron curvas de saturación de la unión y se determinaron las constantes de disociación por medio del análisis Scatchard.

Ejemplo 2. Clonación de ADNc que codifica V_H y V_K de KS-1/4 de ratón y construcción de vector para la expresión de anticuerpo derivado de hibridoma KS-1/4

25 Se transcribió en forma inversa el ARN mensajero preparado a partir del hibridoma que expresaba KS-1/4 de ratón (obtenido de R. Reisfeld, Scripps Research Institute) con oligo (dT) y después se utilizó como plantillas para la reacción en cadena de la polimerasa a los fines de amplificar las secuencias que codifican la región variable de la cadena pesada (V_H) y la región variable de la cadena ligera (V_K). Los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa se diseñaron en base a las secuencias publicadas (Beavers et al., *ibid.*). Los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa para V_H tuvieron las siguientes secuencias:

El cebador directo para V_H (5') GACTCGAGCCCAAGTCTTAGACATC (3') (SEQ ID NO: 31)

El cebador inverso para V_H (5') CAAGCTTACCTGAGGAGACGGTGACTGACGTTT (3') (SEQ ID NO: 32)

35 donde las secuencias CTCGAG y AAGCTT representan los sitios de restricción XhoI e HindIII, respectivamente utilizados para ligar el V_H en el vector de expresión (véase abajo); y el TAC en el cebador inverso introduciría GTA, la secuencia de consenso de ensamblaje del donante, en la cadena homosen sentido del producto reacción en cadena de la polimerasa.

Los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa para V_K tuvieron las siguientes secuencias:

40 El cebador directo para V_K (5') GATCTAGACAAGATGGATTTTCAAGTG (3') (SEQ ID NO: 33)

El cebador inverso para V_K (5') GAAGATCTTACGTTTTATTCCAGCTTGG (3') (SEQ ID NO: 34)

45 donde las secuencias TCTAGA y AGATCT representan los sitios de restricción XbaI y BglII, respectivamente, utilizados para ligar V_K en el vector de expresión (véase abajo); y el ATG es el codón de iniciación de la traducción de la cadena ligera, y el TAC en el cebador inverso introduciría GTA, la secuencia de consenso de ensamblaje del donante, en la cadena homosen sentido del producto de reacción en cadena de la polimerasa.

Se clonaron los productos de la reacción en cadena de la polimerasa que codifican la V_H y V_K del anticuerpo KS-1/4 de ratón en vectores pCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se ordenaron en secuencia varios clones V_H y V_K y se determinó la secuencia de consenso de cada uno. Las secuencias V_H y V_K se insertaron de manera escalonada dentro del

vector de expresión pdHL7. Las ligaduras sacaron ventaja de los sitios únicos de XhoI y HindIII para la V_H, y los sitios únicos XbaI y BglII/BamHI para la V_K (el único BglII en el inserto V_K y el único BamHI en el vector tienen extremos salientes compatibles). El constructo resultante se denominó hibridoma pdHL7 chKS-1/4, que ya contenía elementos reguladores de la transcripción y secuencias de región constante Ig humana para la expresión de anticuerpos quiméricos (Gillies et al. (1989) J. Immunol. Methods 125:191).

El vector de expresión pdHL7 fue derivado de pdHL2 [Gillies et al. (1991) Hybridoma 10:347-356], con las siguientes modificaciones: en el vector de expresión pdHL2, las unidades transcripcionales para la cadena ligera y la cadena pesada de citoquina consistían en el potenciador de genes de la cadena pesada de inmunoglobulina y del promotor de metalotioneína. En pdHL7, estas dos unidades transcripcionales consistían en el activador-promotor de CMV [Boshart et al. (1985) Cell 41:521-530]. El ADN que codificaba el activador-promotor de CMV se derivó del fragmento AflIII-HindIII del pcDNA1 comercialmente disponible (Invitrogen Corp., San Diego, CA).

Ejemplo 3. Estudios de expresión de anticuerpos KS-1/4 murinos

Este ejemplo analiza los estudios de expresión que fueron realizados utilizando un plásmido de expresión de anticuerpo que codifica las secuencias de la región V reveladas en la patente estadounidense N° 4975369.

15 3A. Construcción de plásmidos

Para comparar directamente los anticuerpos quiméricos codificados por la secuencia Hibridoma KS-1/4 y aquellas secuencias descritas en la patente estadounidense N° 4975369, se sintetizó el ADN que codificaba la secuencia V_H descrita en la patente estadounidense N° 4975369. Esto después se ligó con el vector de expresión pdHL7 que ya contenía la V_K de KS-1/4. A los fines de construir la secuencia V_H descrita en la patente estadounidense N° 4975369, se obtuvo una parte que codifica el fragmento NdeI-HindIII de la secuencia V_H mediante síntesis química total. Los oligonucleótidos superpuestos se sintetizaron químicamente y se ligaron. El dúplex ligado después fue subclonado en un vector XbaI-HindIII pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA).

Este ADN codifica la secuencia de proteína IQQPQNMRTM de la patente estadounidense N° 4975369. Inmediatamente 3' a la secuencia de codificación está el sitio de ensamblaje del donante que comienza con gta. El ctag en el extremo 5' de la cadena superior es el extremo saliente del sitio de clonación XbaI. El sitio XbaI fue creado sólo para clonar en el poliligador del vector pBluescript. Le siguió inmediatamente el sitio de restricción (CATATG). El agct en el extremo 5' de la cadena inferior es el extremo saliente del sitio de clonación HindIII. Este extremo cohesivo HindIII después se liga con el sitio HindIII en el intrón que precede el gen Cγ1 [Gillies et al. (1991) Hybridoma 10:347-356].

Después de la secuencia de verificación, se aisló el fragmento de restricción NdeI-HindIII. Esto, junto con el fragmento XhoI-NdeI que codifica la mitad N-terminal de V_H se ligó al vector de expresión pdHL7 digerido XhoI-HindIII que contiene la V_K de KS-1/4. El constructo resultante pdHL7-'369 chKS-1/4, contenía la V_K y V_H descritas en la patente estadounidense N° 4975369 (mencionada como chKS-1/4 de US 4975369).

3B. Comparación de anticuerpos hibridoma chKS-1/4 y chKS-1/4 de US 4975369

Se introdujeron los ADNs plásmidos pdHL7-hibridoma chKS-1/4 y pdHL7-'369 chKS-1/4 en paralelo en un riñón humano 293 células por el procedimiento de coprecipitación de fosfato de calcio mencionado con anterioridad. Cinco días después de la transfección, se analizó el medio condicionado por medio de ELISA anti-huFc y ELISA kappa (véase el Ejemplo 1 para procedimientos ELISA) y los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Anticuerpo	ELISA huFc	ELISA Kappa
Hibridoma chKS-1/4	254ng/mL	200ng/mL
chKS-1/4 de US 4975369	14ng/mL	0ng/mL

Los resultados indicaron que el hibridoma chKS-1/4 era expresado y secretado con normalidad y que el anticuerpo secretado consistía en cantidades aproximadamente equimolares de cadenas pesada y ligera, dentro de la precisión de los dos ELISA diferentes. Por otro lado, solo se detectó un bajo nivel de cadena pesada en el medio condicionado para el anticuerpo chKS-1/4 de US 4975369 y no se asoció con éste ninguna cadena ligera kappa.

Los análisis Western blot se realizaron en el total de los lisados celulares y en los medios condicionados de las dos líneas celulares transfectadas transitoriamente. Se siguieron los procedimientos de análisis Western blot según lo descrito en (Sambrook *et al.* (1989), *supra*). A los fines de analizar el total de los lisados celulares, las células transfectadas fueron lisadas, centrifugadas para eliminar desechos, y el lisado del equivalente a 5×10^5 células se aplicó por calle. Para analizar el medio condicionado, el producto proteico de 300 μ l del medio condicionado primero se purificó por medio de cromatografía de Proteína A Sefarosa previo a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Después de la transferencia de Western blot, se hibridizó el blot con un conjugado de cabra anti-humano IgG, Fc γ (Jackson ImmunoResearch) con peroxidasa de rábano picante, utilizado en una dilución 1:2000.

La transferencia de Western blot mostró que bajo las condiciones utilizadas, se detectó la cadena pesada en el medio condicionado y en las células lisadas de la transfección con pdHL7-hibridoma chKS-1/4. Este resultado indica que la cadena pesada del anticuerpo chKS-1/4 se produjo en las células y se secretó de manera eficiente (junto con la cadena ligera). Por otro lado, la cadena pesada de la transfección con pdHL7-'369 chKS-1/4 se detectó sólo en el lisado celular, pero no en el medio condicionado. Este resultado indica que si bien se produjo un nivel comparable de cadena pesada dentro de la célula, éste no fue secretado. Esta conclusión es consistente con los datos de ELISA, que mostró que no había cadena ligera kappa asociada con la pequeña cantidad de la cadena pesada secretada en el anticuerpo chKS-1/4 de US 4975369. Se entiende que las cadenas pesadas de inmunoglobulina normalmente no son secretadas en ausencia de cadenas ligeras de inmunoglobulina [Hendershot *et al.* (1987) *Immunology Today* 8:111].

Además de lo anterior, se transfectaron células NS/0 por electroporación con los plásmidos pdHL7-Hibridoma chKS-1/4 y pdHL7-chKS-1/4 de US 4975369 en paralelo. Se seleccionaron los clones estables en presencia de 100nm de MTX, como se describe en el Ejemplo 1, y se ensayó el medio condicionado de los clones resistentes al MTX en las placas de 96 pocillos mediante ELISA anti-huFc, como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Anticuerpo	Nº total de clones analizados	Modo*	Nivel de expresión más alto*
Hibridoma chKS-1/4	80	0,1-0,5 μ g/mL (41)	10-50 μ g/mL (4)
chKS-1/4 de US 4975369	47	0-10ng/mL (36)	0,1-0,4 μ g/mL (4)

(* Los números entre paréntesis indican la cantidad de clones en el modo o el número que expresó los niveles más altos del producto, según se determinó mediante ELISA anti-Fc.)

Cuando se analizó en el paso de 96 pozos, la mayoría de los clones obtenidos con el constructo pdHL7-hibridoma chKS-1/4 produjo aproximadamente de 100ng/mL a 500ng/mL del anticuerpo, donde los mejores clones produjeron entre 10-50 μ g/mL. Por otro lado, la mayoría de los clones obtenidos con el constructo pdHL7-'369 chKS-1/4 produjo aproximadamente de 0ng/mL a 10ng/mL de anticuerpo, donde los mejores produjeron aproximadamente de 300 a 400ng/mL. Para examinar la composición y las propiedades de unión del anticuerpo chKS-1/4 de US4975369, fue necesario cultivar los clones que producían de 300 a 400ng/mL. Se seleccionaron dos de estos clones para la expansión. Sin embargo, se determinó que sus niveles de expansión eran muy inestables. Para cuando los cultivos habían crecido a 200mL, los niveles de expresión de ambos clones habían descendido a aproximadamente 20ng/mL, como se analizó mediante anti-Fc ELISA. Cuando se analizaron los mismos medios condicionados mediante anti-kappa ELISA, no se detectó ninguna cadena ligera kappa, como en el caso de la expresión transitoria en 293 células.

El siguiente experimento indicó que ninguna cadena ligera kappa estaba asociada con la cadena pesada del anticuerpo chKS-1/4 de US 4975369. Brevemente, se concentraron 50mL por cada uno de los medios condicionados de cada uno de los clones mediante cromatografía de Proteína A. Los elementos eluidos se evaluaron mediante anti-fc ELISA y anti-kappa ELISA. Como control, se trató un medio condicionado de un hibridoma chKS-1/4 que produce clones de la misma manera y se probó al mismo tiempo. Los resultados del ELISA se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Anticuerpo	huFc ELISA	Kappa ELISA
Hibridoma chKS-1/4	42µg/mL	44µg/mL
US4975369 chKS-1/4-clon 1	253ng/mL	0ng/mL
US4975369 chKS-1/4-clon 2	313ng/mL	0ng/mL

5 Los resultados mostraron que no había cadena ligera kappa detectable asociada con la cadena pesada US4975369 chKS-1/4-clon 1. Además, se mostró que el anticuerpo hibridoma chKS-1/4 se une al antígeno KS a 10-20ng/mL, mientras que el anticuerpo de US4975369 de ambos clones y concentrado a 253 y 313ng/mL, no se une al antígeno KS (véase el Ejemplo 9 para medir la unión al antígeno KS).

Ejemplo 4. Expresión y caracterización de variantes de anticuerpos KS

10 Se cree que las mutaciones que reducen considerablemente la expresión o afinidad de un anticuerpo para una molécula diana serán menos efectivas para fines terapéuticos en humanos. Algunos enfoques para la reducción de inmunogenicidad, tales como “modificación superficial” (veneering), “humanización” y “desinmunización” involucran la introducción de muchas sustituciones de aminoácidos, y pueden dañar el enlace de un anticuerpo a un antígeno (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5639641 y 5585089 y la publicación PCT N° WO 98/52976, WO 00/34317).
15 Existe una necesidad en el arte de secuencias de anticuerpo que se enlacen con la molécula de adhesión celular epitelial, pero que sean diferentes de los anticuerpos monoclonales de ratón originales que reconocen este antígeno.

Se probaron varias combinaciones de regiones variables (“V”) de cadena liviana y pesada KS-1/4 para evaluar su capacidad de expresión, y su capacidad de unión con MAC Epitelial. Los resultados se resumen en las Tablas 4-6 y se describen a continuación.

Tabla 4. Secuencias de regiones V de cadena liviana y pesada de anticuerpo KS-1/4.

Cadenas ligeras:

	10	20	30	40	50	60	
VK0	QILLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMLWYQQKPGSSPKPWIFDTSNLASGFPPAR						
VK1	QIVLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYILWYQQKPGQPPKPWIFDTSNLASGFPSR						
VK6	EIVLTQSPATLSLSPGERVTLTCSASSSVSYMLWYQQKPGQAPKLLIFDTSNLASGIPAR						
VK7	QILLTQSPAIMSASPGERVTMTCSASSSVSYMLWYQQKPGSSPKPWIFDTSNLASGFPPAR						
VK8	EIVLTQSPATLSLSPGERVTLTCSASSSVSYMLWYQQKPGSSPKPWIFDTSNLASGFPPAR						
	70	80	90	100			
VK0	FSGSGSGTYSYSLIISMEAEADAATYYCHQRSGYPTYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 1)						
VK1	FSGSGSGTYSYTLTINSLEAEADAATYYCHQRSGYPTYFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 11)						
VK6	FSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCHQRSGYPTYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 7)						
VK7	FSGSGSGTYSYSLIISMEPEADAATYYCHQRSGYPTYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 8)						
VK8	FSGSGSGTYSYSLIISMEAEADAATYYCHQRSGYPTYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 9)						

Cadenas pesadas:

	10	20	30	40	50	60	
VH0	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWWVKQTPGKGLKWMGWINTYTGPEPTY						
VH1	QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWWVROAPGKGLKWMGWINTYTGPEPTY						
VH2	QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWWVROAPGKGLKWMGWINTYTGPEPTY						
VH2.5	QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWWVROAPGKGLKWMGWINTYTGPEPTY						
VH6	QVQLVQSGAEVKKPGEVVKISCKASGYTFTNYGMNWWVROAPGKGLKWMGWINTYTGPEPTY						
VH7	QIQLVQSGAEVKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWWVKQTPGKGLKWMGWINTYTGPEPTY						
VH369	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWWVKQTPGKGLKWMGWINTYTGPEPTY						
	70	80	90	100	110		
VH0	ADDFKGRFAFSLETSASTAFLQINNLRNE.DMATYFCVRFISKGDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 2)						
VH1	ADDFKGRFTTITAETSTSTLYLQLNNLRSE.DTATYFCVRFMSKGDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 21)						
VH2	ADDFKGRFTTITAETSTSTLYLQLNNLRSE.DTATYFCVRFISKGDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 22)						
VH2.5	ADDFKGRFTTITAETSTSTLYLQLNNLRSE.DTATYFCVRFISKGDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 19)						
VH6	AQKRFQGRVTISLDTSTSTAYLQLSSLRAE.DTAVYFCVRFISKGDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 17)						
VH7	ADDFKGRFAFSLETSTSTAFLOINNLRSE.DTATYFCVRFISKGDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 18)						
VH369	ADDFKGRFAFSLETSASTAFLQIqppgmmr ^t MATYFCVRFISKGDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 35)						

Tabla 5. Secuencias de variantes de anticuerpo KS-1/4 y variantes de cadena pesada de región CDR3 con inserciones de aminoácidos individuales

Sec. parcial VH2:	... ATYFCVRF I S K GDYWGQG...	(residuos de amino ácidos 92-109 de SEQ ID NO: 22)
VH2.1:	... ATYFCVRF IIS K GDYWGQG...	(SEQ ID NO: 36)
VH2.2:	...ATYFCVRF IVS K GDYWGQG...	(SEQ ID NO: 37)
VH2.3:	...ATYFCVRF I SAK GDYWGQG...	(SEQ ID NO: 38)
VH2.4:	...ATYFCVRF I S KTDYWGQG...	(SEQ ID NO: 39)

Tabla 6. Niveles de expresión y actividad de enlace de variantes de anticuerpos KS-1/4

Construccto	Expresión		Afinidad MAC Epitelial	
	Transitorio (*) (en ng/mL)	Estable (*) (en µg/mL)	Enlace relativo (**)	Kd (nM)
Grupo 1				
VK0/VH0 (Hibridoma chKS-1/4)		10 - 50	1x	1.0 x 10 ⁻⁹
VK0/VH'369 ('369 chKS-1/4)		0.1 - 0.4(***)	>>30x	
VK8/VH7 (Construccto 3)		10 - 50		1.0 x 10 ⁻⁹
VK6/VH6 (Construccto 1)	300		n.d	
VK7/VH7 (Construccto 2)	30			
VK8/VH7-IL2		10 - 50		1.0 x 10 ⁻⁹
VK1/VH1-IL2		10 - 50		7.9 x 10 ⁻⁹
VK1/VH2-IL2		10 - 50		3.1 x 10 ⁻⁹
Grupo 2				
VK8/VH7 (Construccto 3; control)	1500		1x	
VK0/VH1	1500		8x	
VK1/VH7	1500		1x	
VK1/VH1	1500		2x	
VK1/VH2	1500		1x-2x	

(continuación)

Construeto	Expresión		Afinidad MAC Epitelial	
	Transitorio (*) (en ng/mL)	Estable (*) (en µg/mL)	Enlace relativo (**)	Kd (nM)
VK1/VH1-IL2	1500		5x	
VK1/VH2-IL2	1500		1.5x	
VK1/VH2.5-IL2	1500		3x-4x	
Grupo 3				
VK8/VH7-IL2 (control)	760		1x	
VK1/VH1-IL2	350		2x	
VK1/VH2.1-IL2	290		>10x	
VK1/VH2.2-IL2	270		>10x	
VK1/VH2.3-IL2	190		7x	
VK1/VH2.4-IL2	210		3x	

(*) Niveles normalmente alcanzables.

(**) "Enlace relativo" se expresa como el incremento de x veces en la concentración de proteína requerida para alcanzar un nivel equivalente de enlace. Por lo tanto, un número más alto refleja una menor afinidad para MAC Epitelial.

(***) La cadena ligera kappa no fue detectable mediante ELISA (equivalente al fondo); por lo tanto, los anticuerpos funcionales no se expresaron.

(****) n.d.: no detectable.

En el Grupo 2 y el Grupo 3, la actividad de enlace relativo de cada proteína se normalizó con respecto al control que se muestra en el primer cuadro de ese grupo. El ensayo ELISA es principalmente un reflejo de constantes de disociación, en base a la cantidad de proteína unida después de varias rondas de lavado. Se utiliza como un método de reconocimiento rápido para eliminar aquellos con poca capacidad de unión, pero no es una medición precisa de afinidad.

En el Grupo 3, las variantes de VH2 VH2.1-VH2.4 se compararon con VH1 para determinar si las inserciones de aminoácidos podrían producir un enlace relativo mejorado.

5

Las secuencias se relacionan de la siguiente manera. Como se describe en los ejemplos, las secuencias VH0 y VK0 se derivan de la amplificación PCR de una línea celular hibridoma que expresa el KS-1/4 derivado de ratón original (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2). VH-'369 es la secuencia VHA revelada en la patente estadounidense N° 4975369. Las secuencias VH1, VH2, VH2.1-2.4, VK1 y VK2 se derivaron utilizando ya sea tecnología de desinmunización donde los epítomos de células T potenciales se eliminaron o debilitaron mediante la introducción de mutaciones para reducir el enlace de un epítomo de péptido a una molécula Clase II MHC, o cambiando epítomos de células T no humanas de modo tal que correspondan con auto-epítomos humanos presentes en anticuerpos humanos. El diseño de estos constructos se describe y analiza a continuación. Los constructos de la Tabla 6 se generaron mediante

transfección de células de mamíferos con combinaciones de ácidos nucleicos que expresaban las regiones V de cadena ligera y pesada correspondientes. Las secuencias VH6, VH7, VK6, VK7 y VK8 se generaron mediante el cambio de residuos superficiales del hibridoma KS-1/4 a equivalentes humanos como se describe a continuación, con el objetivo de eliminar epítomos de células B potenciales. Los constructos 1 a 3 se generaron mediante la transfección de células de mamíferos con combinaciones de ácidos nucleicos que expresaban las regiones V de cadena ligera y pesada VH6, VH7, VK6, VK7 y VK8 como se describe en la Tabla 4 y a continuación.

4A. Caracterización de anticuerpos KS con menos epítomos de células T humanas

Las secuencias VH2.1-VH2.5 se realizaron para evaluar si ciertas inserciones de aminoácidos y sustituciones en la región del CDR3 de la cadena pesada de KS-1/4 podían ser toleradas. Se construyeron los vectores de expresión para las combinaciones de cadena pesada y ligera VKO/VH1, VK1/VH7, VK1/VH2, VK1/VH1-IL2, VK1/VH2-IL2 y VK1/VH2.5-IL2 y los anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpo-IL2 se expresaron y evaluaron mediante los métodos que se describen en los ejemplos precedentes.

Específicamente, las secuencias VH1, VH2, VK1 y VK2 se obtuvieron mediante síntesis química total. Para cada una de las secuencias, una serie de oligonucleótidos superpuestos que abarcan todas las cadenas codificadoras y complementarias de estas regiones se sometió a síntesis química, fosforilación y ligación. Las moléculas dúplex ligadas se amplificaron mediante PCR con cebadores apropiados a los extremos de fragmentos, se introdujeron en un vector pCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se verificaron las secuencias. Estos fragmentos de ADN se introdujeron en el vector de expresión pdHL7 en lugares apropiados para generar la cadena pesada ("H") y ligera ("L") completas, respectivamente.

La secuencia VH2.5 se derivó de VH2 mediante la modificación de un solo codón para obtener un Thr en lugar de un Gln en la posición 108 (Tabla 4), utilizando técnicas estándares de biología molecular.

Los anticuerpos se evaluaron mediante ELISA (Tabla 6) y utilizando resonancia de plasmones superficiales (máquina y software Biacore) para comparar su capacidad de unirse a MAC Epiteial. Se consideró que los resultados de los experimentos ELISA reflejaron principalmente constante de disociación y no constante de afinidad, y fueron en general menos precisos, de modo tal que un resultado de ELISA escaso se utilizó en general para excluir ciertos constructos en futuras consideraciones. Sin embargo, fue necesario caracterizar más a los anticuerpos que mostraron un buen enlace en el ensayo ELISA.

Los resultados del análisis de resonancia de plasmones superficiales fueron los siguientes:

Proteína de fusión	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	KD(M)
VK8/VH7-IL2	3.1×10^5	3.2×10^{-4}	1.0×10^{-9}
VK1/VH2-IL2	1.7×10^5	5.3×10^{-4}	3.1×10^{-9}
VK1/VH1-IL2	2.8×10^5	2.2×10^{-3}	7.9×10^{-9}

Debido a que la constante de disociación de VK1/VH1-IL2 fue mucho más rápida que para VK1/VH2-IL2 o VK8/VH7-IL2, VK1/VH1-IL2 se consideró una proteína de fusión menos útil.

Teniendo en cuenta que VK1/VH1-IL2 y VK1/VH2-IL2 difieren sólo por la diferencia metionina/isoleucina en la posición V_H 100 en CDR3, la constante de disociación mejorada de VK1/VH1-IL2 comparada con VK1/VH2-IL2 sugiere que esta posición hace un contacto hidrofóbico con MAC Epiteial, y que la cadena lateral metionina apenas más larga hace un contacto menos efectivo. En el campo de las interacciones de proteína y con proteína, generalmente se considera que las interacciones hidrofóbicas juegan un rol primordial en la determinación de constantes de disociación pero un rol mucho menos importante en la determinación de constantes de afinidad.

4B. Caracterización de variantes de KS-1/4 con inserciones de aminoácidos individuales

La importancia de las secuencia CDR3 en la región V de cadena pesada para la afinidad del anticuerpo KS con MAC Epiteial se determinó con una serie de variantes que contenían una inserción o sustitución de aminoácido en esta región. Se generaron secuencias de VH2.1, VH2.2, VH2.3 y VH2.4 mediante la manipulación de un vector de expresión que codifica VH2 y VK1 utilizando técnicas de ADN recombinante estándares. Los vectores de expresión resultantes se transfectaron en células NS/0 y secretaron proteínas de anticuerpos purificadas como se describe en los ejemplos precedentes.

Se encontró que la variante VH1 fue subóptima en comparación con la variante VH2, que indica que la isoleucina en CDR3 no pudo sustituirse con metionina. El siguiente objetivo era probar si la inserción de un amino ácido en CDR3 podía producir una región V de cadena pesada de KS-1/4 con mejores características de unión que VH1. Los datos en la Tabla 6 comparan la unión de VK1/VH2.1, VK1/VH2.2, VK1/VH2.3 y VK1/VH2.4, con VK1/VH1. Se encontró que ninguno de los constructos con inserción de amino ácidos en CDR3 de V_H de KS-1/4 mostró una unión al antígeno mejorada en comparación con VH1, en cambio, la actividad de unión al antígeno de los mutantes de inserción se vio reducida un poco o en gran medida.

Estos resultados indican que la inserción de aminoácidos en CDR3 generalmente es perjudicial para la actividad de unión al antígeno de las regiones V de cadena pesada de KS-1/4. Al analizar esta información, surgen algunas conclusiones generales. Específicamente, el segmento de amino ácidos V_H de KS-1/4 en las posiciones de 84 a 108, que consiste en Asn-Asn-Leu-Arg-Asn-Glu-Asp-Met-Ala-Thr-Tyr-Phe-Cys-Val-Arg-Phe-Ile-Ser-Lys-Gly-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln, es importante para la unión al antígeno de KS-1/4. Este segmento incluye un segmento marco, Asn-Asn-Leu-Arg-Asn-Glu-Asp-Met-Ala-Thr-Tyr-Phe-Cys-Val-Arg, que en general es tolerante para sustituciones de amino ácidos individuales y múltiples, pero no para inserciones de aminoácidos, que pueden tener un efecto perjudicial sobre la expresión o ensamblaje. Además, la información sugiere que para los aminoácidos en las posiciones 86, 91, 93, 94 y 95, es preferible tener amino ácidos hidrofóbicos para un anticuerpo que se expresa y une con MAC Epitelial de manera eficiente.

La inserción de un amino ácido en el segmento CDR3 V_H, que consiste en Phe-Ile-Ser-Lys-Gly-Asp-Tyr, generalmente es perjudicial para la función de unión al antígeno MAC Epitelial de un anticuerpo KS-1/4, aunque ciertas inserciones pueden tolerarse con sólo una pérdida parcial de actividad. De manera similar, la sustitución de estas posiciones también es perjudicial en general para la unión del antígeno MAC Epitelial, aunque algunas inserciones pueden tolerarse con sólo una pérdida parcial de actividad.

4C. Construcción de derivados activos de anticuerpos KS-1/4 con residuos superficiales de ratón convertidos en sus equivalentes humanos

Se prepararon anticuerpos mediante la sustitución de aminoácidos dentro del anticuerpo KS-1/4 con aminoácidos que se encuentran comúnmente en anticuerpos humanos para minimizar la inmunogenicidad de las regiones V derivadas de ratón. Los derivados KS preferentes también retuvieron la afinidad a la unión específica con MAC Epitelial humana.

Construeto 1. Se encontró que la cadena ligera de KS-1/4 se asemejaba mucho al subgrupo III de consenso humano y la cadena pesada se asemejaba mucho al subgrupo I. En base a estas similitudes, se generó una secuencia conceptual que consistía en los aminoácidos del subgrupo de consenso humano y regiones CDR derivadas de KS-1/4 y aminoácidos de no consenso. Para este y los siguientes constructos se generó un modelo tridimensional utilizando una estación de trabajo Silicon Graphics y software de diseño molecular BioSym.

La inspección de los modelos tridimensionales reveló que ciertos aminoácidos derivados de humanos estaban cerca de las regiones CDR y probablemente podían influir en su conformación. En base a este análisis, en la cadena ligera, se cambió Ser22, Arg44 y Phe66 humanos por Thr, Lys y Tyr, respectivamente. En la cadena pesada, se consideró que tales cambios eran innecesarios. En el diseño final del Construeto 1, la cadena ligera tenía 18 aminoácidos humanos no encontrados en la cadena ligera de ratón, y la cadena pesada tenía 22 aminoácidos humanos no encontrados en la cadena pesada de ratón.

Se crearon ADNs para la expresión del Construeto 1 utilizando oligonucleótidos sintéticos. La proteína del construeto 1 se expresó de manera eficaz pero se encontró que era 10 veces menos activa en un ensayo de unión a MAC Epitelial.

Construeto 2. Se tomó después un enfoque menos agresivo, y se introdujeron sólo los siguientes cambios:

Cadena ligera: K18P, A79P

Cadena pesada: P9A, L11V, A76T, N88S, M91T

Se creó ADN para la expresión del Construeto 2 utilizando oligonucleótidos sintéticos y técnicas de ADN recombinante estándares. La proteína del Construeto 2 no se expresó de manera eficaz. Se encontró también que la combinación de la cadena ligera del Construeto 2 y la cadena pesada de KS-1/4 de ratón no se expresó de manera eficaz, mientras que la combinación de la cadena pesada del Construeto 2 y la cadena ligera de KS-1/4 de ratón se expresó de manera eficaz. Por lo tanto, el defecto de expresión parecía yacer en la cadena ligera del Construeto 2.

Construeto 3. En base al defecto de expresión aparente en la cadena ligera del Construeto 2, se construyó una nueva cadena ligera mediante la fusión de la parte N-terminal de la cadena ligera del Construeto 1 con la parte C-

terminal de la cadena ligera de ratón. Se utilizó el sitio Kpnl, que codifica los aminoácidos en las posiciones 35 y 36. Cuando se combinó esta cadena ligera con la cadena pesada del Constructo 2, se observó una expresión eficiente y ninguna pérdida significativa de unión.

Debido a que el Constructo 3 dio como resultado un anticuerpo con propiedades superiores en términos de expresión de proteínas y afinidad para el antígeno en comparación con el Constructo 1 ó 2, las secuencias de ADN del Constructo 3 se insertan en pdHL7s-IL2, lo cual da como resultado pdHL7s-VK8/VH7-IL2, que se revela como la SEQ ID NO:40. A los fines de la expresión, se introdujo ADN plásmido en las células de mieloma NS/O de ratón por electroporación. El medio de cultivo tomado de clones estables se analizó para determinar la expresión de anticuerpo en un ensayo ELISA recubierto de Fc humano, como se describe en el Ejemplo 1B. Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera para esta proteína de fusión de anticuerpo se muestran en la SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42, respectivamente.

Además, la unión de VK8/VH7 yodado y VK8/VH7-IL2 con MAC Epitelial expresada en la superficie de las células tumorales PC-3 se comparó con la unión de VK0/VH0-IL2 yodado, utilizando los métodos que se describen en el Ejemplo 1F. Dentro del error experimental, se encontraron afinidades esencialmente idénticas para VK8/VH7 y VK0/VH0, y para VK8/VH7-IL2 y VK0/VH0-IL2.

4D. Relaciones estructura-función útiles en la construcción de anticuerpos KS-1/4 activos

Consideradas en conjunto, las actividades de unión al antígeno de los anticuerpos KS-1/4 y las proteínas de fusión con las secuencias de la región V divulgadas proporcionan una guía para el diseño de secuencias de anticuerpos KS-1/4 a la MAC Epitelial, y una buena expresión y secreción de anticuerpos KS-1/4. En particular, las regiones V de cadena pesada y ligera de KS-1/4 puede tolerar múltiples sustituciones de aminoácidos y retener actividad, siempre que estas sustituciones de amino ácidos estén fuera de las regiones CDR. Las regiones V de cadena pesada y ligera de KS-1/4 generalmente no parecen tolerar las inserciones de aminoácidos, en especial dentro de las regiones CDR o regiones FW entre regiones CDR.

Por ejemplo, si la secuencia de hibridoma KS-1/4 se toma como una secuencia inicial "tipo salvaje", los datos indican que la región V de cadena pesada puede tolerar sustituciones de aminoácidos en las posiciones 9, 11, 16, 17, 38, 40, 69, 70, 71, 72, 76, 79, 80, 83, 88, 91 y 111 con poca o sin actividad. En forma similar, la cadena ligera puede tolerar sustituciones de aminoácidos en las posiciones 1, 3, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 21, 41, 42, 59, 71, 73, 75, 77, y 103 con poca o sin actividad. Estos cambios se producen fuera de las regiones CDR de las regiones V de cadena pesada y ligera de KS-1/4. Las 17 sustituciones de amino ácidos de cadena pesada claramente aceptables representan aproximadamente el 21% de las posiciones de aminoácidos fuera de las regiones CDR, y aproximadamente el 68% de las posiciones de aminoácidos fuera de las regiones CDR para las cuales se intentó una sustitución de aminoácidos. De manera similar, las dieciocho sustituciones de amino ácidos de cadena ligera claramente aceptables representan aproximadamente el 23% de las posiciones de aminoácidos fuera de las regiones CDR, y aproximadamente el 72% de las posiciones de aminoácidos fuera de las regiones CDR para las cuales se intentó una sustitución de aminoácidos. Sólo hubo dos ejemplos de una sustitución de aminoácidos fuera de una región CDR que dio como resultado una proteína considerablemente menos útil: la sustitución Ala79Pro en la cadena ligera, que pareció tener un impacto negativo en la expresión; y la sustitución Q108T en la cadena pesada, que tuvo un impacto negativo en la unión al antígeno. Por lo tanto, puede insertarse una sustitución de aminoácido en una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo KS-1/4 fuera de una región CDR, y existe una alta probabilidad de que la sustitución de cómo resultado una proteína activa.

Las mutaciones que involucran la sustitución de un aminoácido en una región CDR a menudo tienen un impacto negativo en la unión al antígeno. Por ejemplo, la sustitución I100M en la cadena pesada reduce la unión aproximadamente 8 veces. Las mutaciones que involucran la inserción de un aminoácido generalmente tienen un impacto negativo en la utilidad de una secuencia KS-1/4. Por ejemplo, la región V de cadena pesada VH2-'369 es incapaz de ensamblarse en un anticuerpo apropiado con una cadena ligera, como se describe en la presente invención. Las mutaciones VH2.1 a 2.4 tienen una inserción de un aminoácido en la región CDR3 de la región V de cadena pesada, y cada una de estas mutaciones tiene un impacto negativo sobre la unión al antígeno.

Ejemplo 5. Inmunogenicidad de una proteína de fusión de anticuerpo KS (Constructo 3)-IL2 en humanos

En un ensayo clínico humano, veintidós pacientes recibieron uno o más regímenes de tratamiento, y cada régimen de tratamiento comprendía tres infusiones intravenosas de 4 horas diarias consecutivas del anticuerpo KS (Constructo 3)-IL2. Cada régimen de tratamiento se realizó a un mes de distancia del otro (Weber et al. (2001). Proc. Am. Soc. Clin. Oncology 20:259a.). Se tomaron muestras de suero de cada paciente antes y después de cada régimen de tratamiento y se analizaron para determinar la reactividad del anticuerpo contra toda la molécula de anticuerpo KS (Constructo 3)-IL2 o el componente Fc-IL2 (sin la región Fv). No se observó reactividad en ninguno de los sueros pre-inmunes. Los resultados indican que sólo 4 pacientes experimentaron un respuesta inmune importante contra sólo las regiones Fv o contra las regiones Fv y el componente Fc-IL2. Además, estas respuestas no parecieron verse promovidas por subsiguiente exposición a huKS-IL2.

5 Se cree que la utilización de la proteína de fusión de anticuerpo-IL2 constituye una prueba particularmente estricta de la inmunogenicidad en la región V, ya que la fracción de interleucina-2 tiene un efecto adyuvante. Por lo tanto, los resultados indican que el anticuerpo KS (Constructo 3) puede administrarse a humanos y sólo un pequeño número de receptores desarrolla aparentemente una respuesta de anticuerpo a la proteína de fusión de anticuerpo KS (Constructo 3)-IL2. Estos resultados son particularmente alentadores teniendo en cuenta el hecho de que el anticuerpo KS (Constructo 3) contiene una región variable de origen casi completamente murino pero donde sólo se reemplazaron pocos residuos de aminoácidos con los residuos de aminoácidos humanos correspondientes.

Por lo tanto, las realizaciones precedentes han de considerarse en todo sentido ilustrativas y no limitativas de la invención descrita en la presente invención.

10 Listado de secuencias

<110> Gillies, Stephen Lo, Kin-Ming Qian, Xiugi Lexigen Pharmaceuticals Corp.

<120> Anticuerpo recombinante para tumor específico y su utilización

<130> LEX-019PC

<150> US 60/288564

15 <151> 2001-05-03

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.0

<210> 1

<211> 106

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ratón KS VK

<400> 1

25

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

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cadena ligera variable en el anticuerpo MAC Epitelial

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1) .. (1)

<223> en donde Xaa en la posición 1 es un ácido glutámico

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

15 <223> en donde Xaa en la posición 3 es una valina

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> en donde Xaa en la posición 10 es una treonina o serina

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> en donde Xaa en la posición 11 es una leucina

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> en donde Xaa en la posición 12 es una alanina

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (13)..(13)

<223> en donde Xaa en la posición 13 es una leucina o valina

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

15 <223> en donde Xaa en la posición 17 es una glutamina

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> en donde Xaa en la posición 18 es una arginina

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> en donde Xaa en la posición 19 es una alanina

<220> <221> misc_feature

25 <222> (21)..(21)

<223> en donde Xaa en la posición 21 es una leucina o isoleucina

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

30 <223> en donde Xaa en la posición 32 es una isoleucina

<220>

<221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> en donde Xaa en la posición 36 es una leucina

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (41)..(41)

<223> en donde Xaa en la posición 41 es una glutamina

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (42)..(42)

<223> en donde Xaa en la posición 42 es una alanina o prolina

<220>

<221> misc_feature

<222> (45)..(45)

15 <223> en donde Xaa en la posición 45 es una leucina

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> en donde Xaa en la posición 46 es una leucina

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (48).. (48)

<223> en donde Xaa en la posición 48 es una tirosina

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> en donde Xaa en la posición 57 es una isoleucina

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (59)..(59)

<223> en donde Xaa en la posición 59 es una serina

<220>

<221> misc_feature

<222> (69)..(69)

<223> en donde Xaa en la posición 69 es un ácido aspártico o una treonina

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (71)..(71)

<223> en donde Xaa en la posición 71 es una treonina

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (73)..(73)

<223> en donde Xaa en la posición 73 es una treonina

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (75)..(75)

<223> en donde Xaa en la posición 75 es una asparagina

<220>

<221> misc_feature

<222> (77)..(77)

20 <223> en donde Xaa en la posición 77 es una leucina

<220>

<221> misc_feature

<222> (79)..(79)

<223> en donde Xaa en la posición 79 es una prolina

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (82)..(82)

<223> en donde Xaa en la posición 82 es un fenilalanina

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (84)..(84)

<223> en donde Xaa en la posición 84 es una valina

<220>

<221> misc feature

<222> (103)..(103)

5 <223> en donde Xaa en la posición 103 es una valina

<400> 3

```

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

<210> 4

<211> 116

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cadena pesada variable en el anticuerpo de MAC Epitelial

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> en donde Xaa en la posición 2 es una isoleucina o una valina

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (9)..(9)

- <223> en donde Xaa en la posición 9 es una prolina o una alanina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
- 5 <223> en donde Xaa en la posición 11 es una leucina o valina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> en donde Xaa en la posición 16 es un ácido glutámico o una serina
- 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> en donde Xaa en la posición 17 es una treonina o serina
 <220>
- 15 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> en donde Xaa en la posición 38 es una lisina o arginina
 <220>
 <221> misc_feature
- 20 <222> (40)..(40)
 <223> en donde Xaa en la posición 40 es una treonina o alanina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
- 25 <223> en donde Xaa en la posición 43 es una lisina o glutamina
 <220> <221> misc_feature
 <222> (46)..(46)
 <223> en donde Xaa en la posición 46 es una lisina o ácido glutámico
 <220>
- 30 <221> msic_feature
 <222> (63)..(63)

- <223> en donde Xaa en la posición 63 es un ácido aspártico o una lisina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (65)..(65)
- 5 <223> en donde Xaa en la posición 65 es una lisina o una glutamina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (68)..(68)
- <223> en donde Xaa en la posición 68 es una fenilalanina o una valina
- 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (69)..(69)
- <223> en donde Xaa en la posición 69 es una alanina, una treonina o una valina
 <220>
- 15 <221> misc_feature
 <222> (70)..(70)
- <223> en donde Xaa en la posición 70 es una fenilalanina o isoleucina
 <220>
 <221> misc_feature
- 20 <222> (71)..(71)
- <223> en donde Xaa en la posición 71 es una serina o treonina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (72)..(72)
- 25 <223> en donde Xaa en la posición 72 es una leucina o alanina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (73)..(73)
- <223> en donde Xaa en la posición 73 es un ácido glutámico o ácido aspártico
- 30 <220>
 <221> misc_feature

<222> (76)..(76)

<223> en donde Xaa en la posición 76 es una alanina o treonina

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (79)..(79)

<223> en donde Xaa en la posición 79 es una alanina o leucina

<220>

<221> misc_feature

<222> (80)..(80)

10 <223> en donde Xaa en la posición 80 es una fenilalanina o tirosina

<220>

<221> misc_feature

<222> (83)..(83)

<223> en donde Xaa en la posición 83 es una isoleucina o una leucina

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (84)..(84)

<223> en donde Xaa en la posición 84 es una asparagina o serina

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (85)..(85)

<223> en donde Xaa en la posición 85 una asparagina o serina

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (88)..(88)

<223> en donde Xaa en la posición 88 una asparagina, una alanina o serina

<220>

<221> misc_feature

<222> (91)..(91)

30 <223> en donde Xaa en la posición 91 es una metionina o treonina

<220>

<221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> en donde Xaa en la posición 93 es una treonina o valina

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (100)..(100)

<223> en donde Xaa en la posición 100 es una isoleucina o metionina

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (108)..(108)

<223> en donde Xaa en la posición 108 es una glutamina o treonina

<220>

<221> misc_feature

<222> (111)..(111)

15 <223> en donde Xaa en la posición 111 es una serina o treonina

<400> 4

```

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

Val Arg Phe Xaa Ser Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr Xaa Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de consenso liviana

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(1)

<223> en donde Xaa en la posición 1 es una glutamina o ácido glutámico

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) ..(3)

15 <223> en donde Xaa en la posición 3 es una leucina o valina

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> en donde Xaa en la posición 10 es una isoleucina o treonina

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> en donde Xaa en la posición 11 es una metionina o leucina

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> en donde Xaa en la posición 13 es una alanina o leucina

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> en donde Xaa en la posición 18 es una lisina o arginina

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> en donde Xaa en la posición 21 es una metionina o leucina

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (41)..(41)

<223> en donde Xaa en la posición 41 es una serina o glutamina

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (42)..(42)

<223> en donde Xaa en la posición 42 es una serina o alanina

<220>

<221> misc_feature

<222> (45)..(45)

20 <223> en donde Xaa en la posición 45 es una prolina o leucina

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> en donde Xaa en la posición 46 es una triptófano o leucina

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> en donde Xaa en la posición 57 es una fenilalanina o isoleucina

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (69)..(69)

<223> en donde Xaa en la posición 69 es una serina o un ácido aspártico

<220>

<221> misc_feature

<222> (71)..(71)

5 <223> en donde Xaa en la posición 71 es una serina o una treonina

<220>

<221> misc_feature

<222> (73).. (73)

<223> en donde Xaa en la posición 73 es una isoleucina o una treonina

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (77)..(77)

<223> en donde Xaa en la posición 77 es una metionina o una leucina

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (79)..(79)

<223> en donde Xaa en la posición 79 es una alanina o una prolina

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (82)..(82)

<223> en donde Xaa en la posición 82 es una alanina o una fenilalanina

<220>

<221> misc_feature

<222> (84)..(84)

25 <223> en donde Xaa en la posición 84 es una treonina o una valina

<400> 5

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

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia pesada consenso

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (2)..(2)

<223> en donde Xaa en la posición 2 es una isoleucina o una valina

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

15 <223> en donde Xaa en la posición 9 es una prolina o una alanina

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> en donde Xaa en la posición 11 es una leucina o una valina

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> en donde Xaa en la posición 17 es una treonina o una serina

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> en donde Xaa en la posición 38 es una lisina o una arginina

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (40)..(40)

<223> en donde Xaa en la posición 40 es una treonina o una alanina

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(46)

15 <223> en donde Xaa en la posición 46 es una lisina o ácido glutámico

<220>

<221> misc_feature

<222> (63)..(63)

<223> en donde Xaa en la posición 63 es un ácido aspártico o una lisina

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (65)..(65)

<223> en donde Xaa en la posición 65 es una lisina o una glutamina

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (68)..(68)

<223> en donde Xaa en la posición 68 es una fenilalanina o una valina

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (69)..(69)

<223> en donde Xaa en la posición 69 es una alanina o una treonina

<220>

<221> misc_feature

<222> (70)..(70)

<223> en donde Xaa en la posición 70 es una fenilalanina o una isoleucina

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (73)..(73)

<223> en donde Xaa en la posición 73 es un ácido glutámico o ácido aspártico

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (76)..(76)

<223> en donde Xaa en la posición 76 es una alanina o una treonina

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (80)..(80)

<223> en donde Xaa en la posición 80 es una fenilalanina o una tirosina

<220>

<221> misc_feature

<222> (83)..(83)

20 <223> en donde Xaa en la posición 83 es una isoleucina o una leucina

<220>

<221> misc_feature

<222> (84)..(84)

<223> en donde Xaa en la posición 84 es una asparagina o una serina

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (85)..(85)

<223> en donde Xaa en la posición 85 es una asparagina o una serina

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (88)..(88)

<223> en donde Xaa en la posición 88 es una asparagina, una alanina o una serina

<220>

<221> misc_feature

<222> (91)..(91)

5 <223> en donde Xaa en la posición 91 es una metionina o una treonina

<220>

<221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> en donde Xaa en la posición 93 es una treonina o una valina

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (108)..(108)

<223> en donde Xaa en la posición 108 es una glutamina o una treonina

<400> 6

15

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

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

Gly Met Asn Trp Val Xaa Gln Xaa Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Xaa Phe
50 55 60

Xaa Gly Arg Xaa Xaa Xaa Ser Leu Xaa Thr Ser Xaa Ser Thr Ala Xaa
65 70 75 80

Leu Gln Xaa Xaa Xaa Leu Arg Xaa Glu Asp Xaa Ala Xaa Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Arg Phe Ile Ser Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Vk6 cadena ligera

<400> 7

```

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

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20           25           30

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
          85           90           95

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

<210> 8

10 <211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VK7 cadena ligera

15 <400> 8

```

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1           5           10           15
    
```

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

<210> 9

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VK8 cadena ligera

<400> 9

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

10

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> KS VK superficialmente modificado

<400> 10

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

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11

10 <211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VK1 desinmunizado de KS

15 <400> 11

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

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VK2 desinmunizado de KS

<400> 12

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

10

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> VK3 desinmunizado de KS

<400> 13

```

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

10 <210> 14

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> VK4 desinmunizado de KS

<400> 14

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

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> KS desinmunizado VK5

<400> 15

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

10

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Ratón KS VK

<400> 16

```

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

<210> 17

10 <211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH6 cadena pesada

15 <400> 17

ES 2 361 664 T3

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

<210> 18

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH7 cadena pesada

<400> 18

ES 2 361 664 T3

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

<210> 19

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH2.5 cadena pesada

<400> 19

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

115

<210> 20

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH de KS superficialmente modificado

<400> 20

10

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

<210> 21

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH1 desinmunizado de KS

<400> 21

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

ES 2 361 664 T3

<400> 23

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Leu Glu Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Val Arg Phe Ile Ser Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

5 <211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH4 desinmunizado de KS

10 <400> 24

ES 2 361 664 T3

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

<210> 25

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH5 desinmunizado de KS

<400> 25

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser

ES 2 361 664 T3

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

<210> 26

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> KS VH de ratón

<400> 26

10

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

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> KSA cebador homosenhido

<400> 27

tctagagcag catggcgccc ccgca 25

10 <210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador antisenhido KSA

<400> 28

ctcgagttat gcattgagtt ccct 24

<210> 29

<211> 17

- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> linker-adapter
- 5 <400> 29
aattctcaat gcagggc 17
- <210> 30
- <211> 17
- <212> DNA
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> linker-adapter
- <400> 30
gagttacgctc ccgaatt 17
- 15 <210> 31
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> cebador directo VH
- <400> 31
gactcgagcc caagtcttag acatc 25
- <210> 32
- <211> 33
- 25 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador inverso VH
- <400> 32
- 30 caagcttacc tgaggagacg gtgactgacg ttc 33
- <210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cebador directo VK

<400> 33

gatctagaca agatggattt tcaagtg 27

<210> 34

<211> 29

10 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador inverso VK

<400> 34

15 gaagatctta cgttttattt ccagcttgg 29

<210> 35

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> VH369 cadena pesada

<400> 35

ES 2 361 664 T3

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

<210> 36

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH2.1 secuencia parcial

<400> 36

10

Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg Phe Ile Ile Ser Lys Gly Asp Tyr Trp
 1 5 10 15
 Gly Gln Gly

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia pdHL7s-VK8/VH7-IL2

5 <400> 40

gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60
 gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 120
 gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 180
 ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 240
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac 300
 atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggccccg 360
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 420
 tattagtcac cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 480
 agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 540
 tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 600
 aaatgggagg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctctc tggctaacta 660
 cagaaccac tgcttactgg cttategaaa ttaatacagac tcactatagg gagaccctct 720
 agaatgaagt tgcctgtag gctgttggtg ctgatgttct ggattcctgg tgaggagaga 780
 gggaaagtgag ggaggagaaat ggacagggag caggagcact gaatcccatt gctcattcca 840
 tgtatctggc atgggtgaga agatgggtct taccctccag catggggcct ctggggtgaa 900
 tacttgtag agggagggtc cagatgggaa catgtgctat aatgaagatt atgaaatgga 960
 tgcctgggat ggtctaagta atgccttaga agtgactaga cacttgcaat tcactttttt 1020
 tggtaagaag agatttttag gctataaaaa aatgttatgt aaaaataaac gatcacagtt 1080
 gaaataaaaa aaaaatataa ggatgttcat gaattttgtg tataactatg tatttctctc 1140
 tcattgttcc agcttcctta agcgagatcg tgctgaccca gtccccgcc accctgtccc 1200
 tgtcccccg cgagcgcgtg accctgacct gctccgctc ctctcctg tgctacatgc 1260
 tgtggtacca gcagaagcca ggatcctcgc ccaaaccctg gatttttgac acatccaacc 1320

tggtttctgg attccctgct cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctct tactctctca 1380
 taatcagcag catggaggct gaagatgctg ccacttatta ctgccatcag cggagtggtt 1440
 acccgtagac gttcggaggg gggaccaagc tggaaataaa acgtaagatc ccgcaattct 1500
 aaactctgag ggggtcggat gacgtggcca ttctttgcct aaagcattga gtttactgca 1560
 aggtcagaaa agcatgcaaa gccctcagaa tggctgcaaa gagctccaac aaaacaattt 1620
 agaactttat taaggaatag ggggaagcta ggaagaaact caaaacatca agattttaaa 1680
 tacgcttctt ggtctccttg ctataattat ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc 1740
 cctaacatgc cctgtgatta tccgcaaaca acacacccaa gggcagaact ttgttactta 1800
 aacaccatcc tgtttgcttc tttcctcagg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt 1860
 cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa 1920
 cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa 1980
 ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac 2040
 cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca 2100
 tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agagggagaa 2160
 gtgccccac ctgctcctca gttccagcct gacccccctcc catcctttgg cctctgacct 2220
 tttttccaca ggggacctac ccctattgcy gtcctccagc tcctctttca cctcaccccc 2280
 ctctcctcc ttggctttaa ttatgctaat gttggaggag aatgaataaa taaagtgaat 2340
 ctttgacct gtggtttctc tctttcctca atttaataat tattatctgt tgtttaccaa 2400
 ctactcaatt tctcttataa gggactaaat atgtagtcat cctaaggcgc ataaccattt 2460
 ataaaaatca tccttcattc tattttacc tctctcctc tgcaagacag tctcctcctca 2520
 aaccacaag ccttctgtcc tcacagtccc ctgggccatg gtaggagaga cttgcttctc 2580
 tgttttcccc tcctcagcaa gccctcatag tcctttttaa gggtgacagg tcttacggtc 2640
 atatatcctt tgattcaatt ccctgggaat caaccaaggc aaatttttca aaagaagaaa 2700
 cctgctataa agagaatcat tcattgcaac atgatataaa ataacaacac aataaaagca 2760
 attaaataaa caaacaatag ggaaatgttt aagttcatca tggtaacttag acttaatgga 2820
 atgtcatgcc ttatttacat ttttaaacag gtactgaggg actcctgtct gcccaagggcc 2880
 gtattgagta ctttocacaa cctaatttaa tccacactat actgtgagat taaaaacatt 2940
 cattaaaatg ttgcaaaggt totataaagc tgagagacaa atatattcta taactcagca 3000
 atcccacttc tagggctgac gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 3060
 tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 3120

ES 2 361 664 T3

tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt 3180
 tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 3240
 aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 3300
 caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 3360
 tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atggatgatgc ggttttggca 3420
 gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat 3480
 tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 3540
 caactccgcc ccattgacgc aaatggggcg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag 3600
 cagagctctc tggctaacta cagaacccac tgcttactgg cttatcgaaa ttaatacgac 3660
 tcactatagg gagacccaag ctctcagagg ctagaatgaa gttgcctggt aggctggtgg 3720
 tgctgatggt ctggattcct ggtgaggaga gagggagtg agggaggaga atggacaggg 3780
 agcaggagca ctgaatccca ttgctcattc catgtatctg gcatgggtga gaagatgggt 3840
 cttatcctcc agcatggggc ctctggggtg aatacttgtt agagggagggt tccagatggg 3900
 aacatgtgct ataatgaaga ttatgaaatg gatgcctggg atggctctaa taatgcctta 3960
 gaagtgacta gacacttgca attcactttt tttggtaaga agagattttt aggctataaa 4020
 aaaatgttat gtaaaaataa acgatcacag ttgaaataa aaaaaaatat aaggatgttc 4080
 atgaattttg tgtataacta tgtattttct tctcattggt tcagcttctt taagccagat 4140
 ccagttgggt cagtctggag ctgagggtga gaagcctgga gagacagtca agatctcctg 4200
 caaggcttct ggggtatacct tcacaaacta tggaatgaac tgggtgaagc agactccagg 4260
 aaagggttta aagtggatgg gctggataaa cacctacact ggagaaccaa catatgctga 4320
 tgacttcaag ggacggtttg ccttctcttt ggaaacctct accagcactg cctttttgca 4380
 gatcaacaat ctcagaagtg aggacacggc tacatatttc tgtgtaagat ttattttctaa 4440
 gggggactac tgggggtcaag gaacgtcagt caccgtctcc tcaggtaagc tttctggggc 4500
 aggccaggcc tgaccttggc tttggggcag ggagggggct aagggtgaggc aggtggcgcc 4560
 agccagggtg acacccaatg cccatgagcc cagacactgg acgctgaacc tcgcggacag 4620
 ttaagaaccc aggggcctct gcgccctggg cccagctctg tcccacaccg cggtcacatg 4680
 gcaccacctc tcttgcagcc tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct 4740
 ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg 4800
 aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccgg 4860
 ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca 4920
 gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg 4980

acaagagagt tggtagagagg ccagcacagg gagggaggggt gtctgctgga agccaggctc 5040
agcgtcctcg cctggacgca tcccggctat gcagtcccag tccagggcag caaggcaggc 5100
cccgtctgcc tcttcacccg gaggcctctg cccgccccac tcatgctcag ggagagggctc 5160
ttctggcttt tccccaggc tctgggcagg cacaggctag gtgcccctaa cccaggccct 5220
gcacacaaag gggcagggtgc tgggctcaga cctgccaaaga gccatatccg ggaggaccct 5280
gccctgacc taagcccacc ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cggacacctt 5340
ctctcctccc agattccagt aactcccaat cttctctctg cagagcccaa atcttgtgac 5400
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagggt aagccagccc aggcctcgcc ctccagctca 5460
aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac agggcccagc cgggtgctga 5520
cacgtccacc tccatctctt cctcagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt 5580
cttcccccca aaaccaagc acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt 5640
ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt 5700
ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt 5760
ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa 5820
ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtgg 5880
gaccctggg gtgagggggc cacatggaca gaggcgggt cggcccaccc tctgccctga 5940
gagtgaccgc tgtaccaacc tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca 6000
ccctgcccc atcacgggag gagatgacca agaaccagggt cagcctgacc tgcctggta 6060
aaggcttcta tcccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag cgggagaaca 6120
actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc 6180
tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg 6240
aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtccccgggt aaagcccca 6300
cttcaagttc tacaagaaa acacagctgc aactggagca tctcctgctg gatctccaga 6360
tgattctgaa tggaattaac aactacaaga atcccaaact caccaggatg ctcacattca 6420
agttctacat gcccaagaag gccacagagc tcaaaccatct ccagtgtcta gaggaggaac 6480
tcaaacctct ggaggaagtg ctaaacctcg ctcagagcaa aaacttccac ttaagacct 6540
gggacttaat cagcaatate aacgtaatag ttctggaact aaagggatcc gaaacaacat 6600
tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga attcctaacc agatggatta 6660
ccttttgtca aagcatcate tcaaacataa cttgataatt aagtgtctga gggatccaga 6720
catgataaga tacattgatg agtttgaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg 6780

ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttga accattagaa gctgcaataa 6840
 acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga 6900
 ggttttttta agcaagtaaa acctctacaa atgtggtatg gctgattatg atcctgcctc 6960
 gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agtcccggga gacggtcaca 7020
 gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtggt 7080
 ggcgggtgtc ggggcgcagc catgaccagc tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc 7140
 ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac 7200
 cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgtc tcccgcttcc tcgctcactg 7260
 actcgtcgcg ctcggtcggt cggctgcggc gagcggatc agtccactca aaggcggtaa 7320
 tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc 7380
 aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc 7440
 ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat 7500
 aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc 7560
 cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcaatgct 7620
 cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg 7680
 aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccgtaa ctatcgtctt gagtccaacc 7740
 cggtaaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga 7800
 ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa 7860
 ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac ctccggaaaa agagttggta 7920
 gctcttgatc cggcaaacia accaccgctg gttagcgggtg ttttttgggt tgcaagcagc 7980
 agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg 8040
 acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga 8100
 tcttcaccta gatcctttta aattaaaat gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg 8160
 agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct 8220
 gtctatctcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctgt gtagataact acgatacggg 8280
 agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc 8340
 cagatttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa 8400
 ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc 8460
 cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctgcagg catcgtggtg tcacgctcgt 8520
 cgtttggtat ggcttcattc agtcccgtt cccaacgatc aaggcaggtt acatgatccc 8580
 ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctcc gatcgttgctc agaagtaagt 8640

ES 2 361 664 T3

tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc 8700
 catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt 8760
 gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaacacg ggataatacc gcgccacata 8820
 gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga 8880
 tcttaccgct gttgagatcc agttegatgt aacccactcg tgcacccaac tgatcttcag 8940
 catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa 9000
 aaaagggat aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat actcttctt tttcaatatt 9060
 attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catattttaa tgtatttaga 9120
 aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag 9180
 aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc 9240
 ttcaagaatt ccgatccaga catgataaga tacattgatg agtttgaca aaccacaact 9300
 agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttga 9360
 accattagaa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag 9420
 gttcaggggg aggtgtggga ggttttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtatg 9480
 gctgattatg atctaaagcc agcaaaagtc ccatggctct ataaaaatgc atagctttcg 9540
 gaggggagca gagaacttga aagcatcttc ctgtagtct tcttctcgt agacctaaa 9600
 ttcatacttg attcctttt cctcctggac ctccagagagg acgcctgggt attctgggag 9660
 aagtttatat ttccccaat caatttctgg gaaaaacgtg tcactttcaa attcctgcat 9720
 gatccttgtc acaaagagtc tgaggtggcc tggttgatcc atggcttctt ggtaaacaga 9780
 actgectccg actatccaaa ccatgtctac tttacttgc aattccggtt gttcaataag 9840
 tcttaaggca tcatccaaac ttttgcaag aaaatgagct cctcgtgggt gttctttgag 9900
 ttctctactg agaactatat taattctgtc ctttaaagggt cgattcttct caggaatgga 9960
 gaaccagggt ttctaccca taatcaccag attctgttta ccttccactg aagaggttgt 10020
 ggtcattctt tggaagtact tgaactcgtt cctgagcggga ggccagggtc ggtctccgtt 10080
 cttgccaatc cccatatttt gggacacggc gacgatgcag ttcaatggtc gaaccatgag 10140
 ggcaccaagc tagctttttg caaaagccta ggctccaaa aaagcctcct cactacttct 10200
 ggaatagctc agaggecgag gcggcctcgg cctctgcata aataaaaaaa attagtcagc 10260
 catggggcgg agaatgggcg gaactgggcg gagttagggg cgggatgggc ggagttaggg 10320
 gcgggactat ggttgctgac taattgagat gcatgctttg catacttctg cctgctgggg 10380
 agcctgggga cttccacac ctggttgctg actaattgag atgcatgctt tgcatacttc 10440

tgctgctgg ggagcctggg gactttccac accctaactg acacacattc caca 10494

<210> 41

<211> 579

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada-IL2

<400> 41

ES 2 361 664 T3

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Thr Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Val Arg Phe Ile Ser Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ala Pro
 435 440 445
 Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
 450 455 460
 Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro
 465 470 475 480
 Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala
 485 490 495
 Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
 500 505 510
 Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
 515 520 525
 Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
 530 535 540
 Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile
 545 550 555 560
 Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser
 565 570 575

Thr Leu Thr

<210> 42

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera

<400> 42

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión anticuerpo-IL2 anti-MAC Epitelial recombinante que comprende la cadena pesada de la SEQ ID No.:41 y la cadena ligera de la SEQ ID No.:42.
- 5 2. Utilización de la proteína de fusión anticuerpo según la reivindicación 1 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
3. Proteína de fusión anticuerpo-IL2 anti-MAC Epitelial recombinante según la reivindicación 1 para su utilización para el tratamiento del cáncer.

