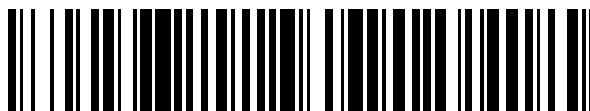


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 641**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2007 E 07741116 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2011869**

54 Título: **Nuevo anticuerpo anti-CD98**

30 Prioridad:

06.04.2006 JP 2006105013

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

02.09.2014

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, OHTEMACHI, CHIYODA-KU
TOKYO, JP**

72 Inventor/es:

**TAHARA, TOMOYUKI;
KANAI, YOSHIKATSU;
ENDOU, HITOSHI;
KATAOKA, SHIRO;
HASEGAWA, KAZUMASA y
YOSHINO, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 489 641 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

Nuevo anticuerpo anti-CD98

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los resultados del desarrollo llevado a cabo en la comisión de nueva tecnología referente al "fármaco anticáncer de anticuerpo anti-proteína transportadora de aminoácidos" asignada por la agencia de ciencia y tecnología japonesa.

10

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que presenta una capacidad de unión específica a CD98, que se deriva de la membrana celular de las células de cáncer y se encuentra en forma de un complejo con una proteína que presenta una actividad de transportador de aminoácidos, y a la utilización farmacéutica del mismo para la supresión del crecimiento tumoral o la terapia del cáncer.

15

Antecedentes de la técnica

20 El cáncer (tumor maligno) es la causa principal de muerte en Japón. El número de pacientes de cáncer se ha ido incrementando cada año y existe una fuerte necesidad de desarrollar fármacos y métodos terapéuticos de elevadas eficacia y seguridad. Los agentes anticáncer convencionales con frecuencia presentan una capacidad reducida de eliminar específicamente las células de cáncer y actúan incluso sobre las células normales, conduciendo a un gran número de reacciones farmacológicas adversas. Recientemente ha progresado el desarrollo de agentes anticáncer con diana en una molécula que se expresa a nivel elevado en las células de cáncer (antígeno relacionado con el cáncer) y estos fármacos se han convertido en agentes terapéuticos eficaces para la leucemia, el cáncer de mama, el cáncer de pulmón y similares.

25

30 Se ha demostrado que un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno relacionado con el cáncer expresado sobre la membrana celular ataca a las células de cáncer mediante la inmunorreacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC) o similar, o suprime la señalización de crecimiento celular necesaria para el crecimiento de las células de cáncer y, de esta manera, resulta útil para la terapia del cáncer.

30

35 Sin embargo, los anticuerpos se utilizan únicamente para el tratamiento de tipos limitados de cáncer, tales como el cáncer de mama, el linfoma crónico refractario, el linfoma no de Hodgkin, la leucemia mielógena aguda y similares, y todavía no existe ningún anticuerpo que pueda utilizarse solo para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, existe una demanda para obtener un anticuerpo que se una fuertemente a diversos tipos de célula de cáncer y que presente actividad anticáncer.

35

40

45 CD98 (4F2) es una cadena glucoproteína transmembranal de tipo II de aproximadamente 80 kDa compuesta de 529 residuos aminoácidos que es conocido que se expresa a nivel elevado en diversos tipos de célula de cáncer. CD98 forma un heterodímero con una proteína de aproximadamente 40 kDa que presenta una actividad de transportador de aminoácidos mediante un enlace disulfuro y se expresa sobre la membrana celular. Se conocen seis tipos de proteínas transportadoras de aminoácidos que se considera que se unen a CD98. Aunque se ha identificado CD98 como antígeno de activación de linfocitos, se considera que participa en un gran número de funciones biológicas, tales como la señalización del crecimiento celular, la activación de las integrinas, la fusión celular y similares (Haynes B.F. *et al.*, J. Immunol. 126:1409-1414, 1981; Lindsten T. *et al.*, Mol. Cell Biol. 8:3820-3826, 1988; Teixeira S. *et al.*, Eur. J. Biochem. 202:819-826, 1991; L. A. Diaz Jr. *et al.*, J Biol Regul Homeost Agents 12:25-32, 1998).

45

50

55 Las células de cáncer presentan diversos mecanismos para garantizar su dominancia durante el crecimiento. Por ejemplo, las células de cáncer sobreexpresan transportador de aminoácidos neutros para incorporar preferentemente los aminoácidos esenciales necesarios para el crecimiento respecto a las células circundantes, lo que se considera uno de dichos mecanismos. El transportador-1 de aminoácidos de tipo L (LAT1), un transportador de aminoácidos que se expresa específicamente y a nivel elevado en las células de cáncer, ha sido clonado recientemente (Kanai *et al.*, J. Biol. Chem. 273:23629-23632, 1998). LAT1 forma un complejo con CD98 y transporta aminoácidos neutros que presentan cadenas laterales grandes, tales como leucina, valina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, histidina y similares de una manera independiente de los iones sodio. Además, es conocido que LAT1 se expresa a un nivel bajo o no se expresa en la mayoría de tejidos normales, excepto en el cerebro, placenta, médula ósea y testículos, aunque su expresión se incrementa conjuntamente con CD98 en los tejidos de tumores malignos humanos, tales como el cáncer colorrectal, el cáncer gástrico, el cáncer de mama, el cáncer pancreático, el cáncer renal, el cáncer laríngeo, el cáncer esofágico, el cáncer de pulmón y similares (Yanagida *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1514:291-302, 2001). Se ha informado de que al reducir la expresión de LAT1 para

55

60

suprimir la incorporación de aminoácidos, se suprime el crecimiento de un tumor en un modelo de ratón trasplantado con cáncer (patente japonesa abierta al público nº 2000-157286) y, de esta manera, se considera que la supresión de la actividad de LAT1 resulta prometedora para la terapia del cáncer.

5 Con respecto a los anticuerpos contra CD98 humano, se ha informado de un anticuerpo monoclonal de ratón que se prepara inmunizando un mamífero no humano, tal como un ratón, con una línea celular expresante de CD98 humano (Haynes *et al.* (ibid.), Masuko T. *et al.*, Cancer Res. 46:1478-1484, 1986, y Freidman A.W. *et al.*, Cell. Immunol. 154:253-263, 1994). Sin embargo, no se conoce si estos anticuerpos anti-CD98 suprimen o no la
10 incorporación de aminoácidos por parte de LAT1. Además, aunque se ha obtenido un anticuerpo contra la región intracelular de LAT-1, no se ha informado de ningún anticuerpo que pueda unirse a LAT1 presente sobre la membrana celular de una célula viva. De acuerdo con lo anterior, en el caso de que se obtenga un anticuerpo que pueda unirse a CD98 ó LAT1 expresado sobre la membrana de la célula de cáncer para suprimir la incorporación de aminoácidos por parte de LAT1, el anticuerpo se considerará un excelente agente terapéutico del cáncer contra cánceres de un amplio espectro.

15 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

Los presentes inventores ahora han obtenido con éxito un anticuerpo que presenta la capacidad específica de unión a CD98 que se deriva de una membrana celular de una célula de cáncer y se encuentra en forma de un complejo con una proteína que presenta una actividad de transportador de aminoácidos, y se ha encontrado que el anticuerpo presenta un efecto de supresión del crecimiento de las células de cáncer y, de esta manera, resulta útil como ingrediente activo de una composición farmacéutica, más concretamente como ingrediente activo de un agente preventivo o terapéutico para tumores. La presente invención se basa en dichos resultados.

25 La presente invención proporciona:

[1]. Un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que presenta cualquier par de secuencias de entre
30 (b) a (g), a continuación, como región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera:

- (b) SEC ID nº 41 y nº 47,
- (c) SEC ID nº 43 y nº 47,
- (d) SEC ID nº 43 y nº 77,
- (e) SEC ID nº 43 y nº 79,
- 35 (f) SEC ID nº 43 y nº 81, y
- (g) SEC ID nº 43 y nº 83.

[2]. El anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo según [1], en el que el fragmento funcional se selecciona de entre el grupo que consiste de Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, Fv unido mediante disulfuro y scFv del anticuerpo.

40 [3] Un conjugado, que comprende:

el anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo según [1] o [2], y un dominio heterogéneo que contiene una proteína de unión, un enzima, un fármaco, una toxina, un inmunomodulador, una parte detectable o una etiqueta.

45 [4] Un ácido nucleico, que presenta la secuencia de un fragmento BgIII-BsiWI y un fragmento Sall-NheI contenido en el vector plásmido C2IgG1/pCR4 (FERM BP-10551), que no contiene ninguna secuencia del vector pCR4.

[5] Un ácido nucleico, que presenta la secuencia contenida en el vector plásmido C2IgG1/pCR4 (FERM BP-10551) y codificante de la región variable del anticuerpo o fragmento de [1].

50 [6] Un vector que comprende el ácido nucleico según [4] o [5].

[7] Una célula que expresa el anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo según cualquiera de [1] o [2].

[8] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo según [1] o [2] a modo de ingrediente activo.

55 [9] Un agente preventivo o terapéutico que comprende el anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo según [1] o [2] a modo de ingrediente activo, para la utilización en la prevención o el tratamiento de un tumor.

[10] El agente preventivo o terapéutico según [9], en el que el tumor contiene una célula de cáncer que expresa CD98 en forma de un complejo con LAT1.

60 [11] El anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo según [1] o [2] o la composición farmacéutica según [8], para la utilización en la prevención o el tratamiento de un tumor.

[12] El agente preventivo o terapéutico según [9] o el anticuerpo o la composición farmacéutica de [11], en el que el tumor es cáncer colorrectal o cáncer de colon.

[13] Un método para producir un anticuerpo, que comprende: introducir el vector según [6] en un huésped, cultivar el huésped y obtener el anticuerpo a partir del cultivo.

[14] Un método para producir un anticuerpo, que comprende: introducir un vector de expresión en un huésped, conteniendo el vector de expresión cualquier par de secuencias de (b) a (g), a continuación:

5

(b) SEC ID nº 40 y nº 46,

(c) SEC ID nº 42 y nº 46,

(d) SEC ID nº 42 y nº 78,

(e) SEC ID nº 42 y nº 80,

10

(f) SEC ID nº 42 y nº 82, y

(g) SEC ID nº 42 y nº 84,

o una secuencia de nucleótidos degenerada de las mismas, en un huésped; cultivar el huésped y obtener el anticuerpo a partir del cultivo.

15

[15] El método según [13] o [14], en el que el huésped se selecciona de entre el grupo que consiste de *E. coli*, células de levadura, células de insecto, células de mamífero, células vegetales, plantas y mamíferos.

[16] Utilización del anticuerpo monoclonal humano o de un fragmento funcional del mismo según [1] o [2], para la preparación de un agente preventivo o un agente terapéutico para la prevención o el tratamiento de un tumor.

[17] La utilización según [16], en la que el tumor contiene una célula de cáncer que expresa CD98 en forma de un complejo con LAT1.

20

[18] La utilización según [16], en la que el tumor es cáncer colorrectal o un cáncer de colon.

De acuerdo con lo anterior, un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo humano que presenta una capacidad de unión específica a CD98, que se deriva de la membrana celular de una célula de cáncer y se encuentra en forma de un complejo con una proteína que presenta una actividad de transportador de aminoácidos, y un fragmento funcional del mismo.

25

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica o un agente preventivo o terapéutico para tumores, que comprende el anticuerpo humano y un fragmento funcional del mismo según la presente invención a modo de ingrediente activo.

30

El anticuerpo humano y un fragmento funcional del mismo según la presente invención se caracteriza porque presenta la capacidad específica de unión a CD98, que se deriva de la membrana celular de una célula de cáncer y se encuentra en forma de un complejo con una proteína que presenta una actividad de transportador de aminoácidos.

35

Además, la composición farmacéutica o el agente preventivo o terapéutico para tumores según la presente invención comprende el anticuerpo humano y un fragmento funcional del mismo según la presente invención a modo de ingrediente activo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40

La fig. 1 muestra la unión de anticuerpo monoclonales anti-CD98 humanos a una línea celular CT26 expresante de CD98 humano/LAT1 humano.

La fig. 2A muestra la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD98 humanos a una línea celular L929 expresante de CD98 humano.

45

La fig. 2B muestra la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD98 humanos a una línea celular L929 expresante de CD98 humano.

La fig. 3 muestra la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD98 humanos a una línea celular humana K562 tratada con tunicamicina.

50

La fig. 4A muestra la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD98 humanos a diversas líneas celulares L929 quiméricas de ratón/humanas expresantes de CD98.

La fig. 4B muestra la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD98 humanos a diversas líneas celulares L929 quiméricas de ratón/humanas expresantes de CD98.

La fig. 5 muestra actividades de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD98 de supresión de la incorporación de aminoácidos por una línea celular de cáncer de vejiga humano T24.

55

La fig. 6A muestra la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD98 humanos a células T sanguíneas periféricas humanas, a células B y a monocitos.

La fig. 6B muestra la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD98 humanos a células T sanguíneas periféricas humanas, a células B y a monocitos.

60

La fig. 7 muestra la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD98 humanos a células sanguíneas periféricas humanas T y B activadas por PHA.

La fig. 8 muestra la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD98 humanos a células endoteliales aórticas humanas (CEAH) y a la línea celular de cáncer colorrectal humana (DLD-1).

La fig. 9A muestra la unión de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD98 a diversas líneas celulares de cáncer.

La fig. 9B muestra la unión de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD98 a diversas líneas celulares de cáncer.

La fig. 10A muestra la unión de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD98 a diversas líneas celulares de cáncer.

La fig. 10B muestra la unión de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD98 a diversas líneas celulares de cáncer.

5 La fig. 11 muestra el volumen tumoral en cada ratón desnudo observado al administrar el anticuerpo monoclonal humano K3 anti-CD98, 3-69-6 ó C2IgG1 en ratones en los que se habían trasplantado células tumorales.

La fig. 12 muestra el resultado de la medición del volumen tumoral tras la administración de un anticuerpo monoclonal humano C2IgG1 anti-CD98 en una dosis de 100 mg/ratón 3 veces cada dos días en ratones portadores de cáncer que presentaban un tumor que había crecido hasta 90 mm³.

10 La fig. 13 muestra la reacción cruzada de anticuerpos monoclonales humanos K3 y C2IgG1 anti-CD98 con una línea celular de células de mono COS-7.

La fig. 14 muestra el resultado de la medición del tamaño tumoral tras la administración de un anticuerpo monoclonal humano C2IgG1 anti-CD98 y rituximab en una dosis de 100 mg/ratón 3 veces a la semana en ratones portadores de cáncer que presentaban un tumor que había crecido hasta 30 a 140 mm³ en el que se había trasplantado la línea celular Ramos de linfoma de Burkitt.

15 La fig. 15 muestra un contenido de agregados medido mediante HPLC en anticuerpos con aminoácidos modificados de anticuerpos monoclonales C2IgG1NS anti-CD98 humanos tras la purificación de los mismos.

La fig. 16A muestra la unión de los anticuerpos monoclonales humanos K3 y C2IgG1 anti-CD98, así como cada anticuerpo de aminoácidos modificados de C2IgG1 a la línea celular L929 expresante de CD98 humano/LAT1 humano.

20 La fig. 16B muestra la unión de los anticuerpos monoclonales humanos K3 y C2IgG1 anti-CD98, así como cada anticuerpo de aminoácidos modificados de C2IgG1 a una línea celular de cáncer colorrectal humano (DLD-1), a una línea celular de linfoma de Burkitt (Ramos), a una línea celular de cáncer colorrectal humano (Colo205) y a células endoteliales aórticas humanas (CEAH).

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Depósito de los microorganismos

30 Los vectores plásmidos C2IgG1/pCR4 y K3/pcR4 que contenían las secuencias de nucleótidos codificantes de la región variable del anticuerpo humano proporcionada por la presente invención se depositaron el 14 de marzo de 2006 en el depósito de organismos de patente internacional, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial avanzadas (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón), con los n° de acceso FERM BP-10551 (indicación para la identificación: C2IgG1/pCR4) y FERM BP-10552 (indicación para la identificación: K3/pCR4), respectivamente.

35 Definiciones

Las anotaciones de una letra utilizadas para la descripción de los aminoácidos en la presente memoria y en las figuras se refieren a los aminoácidos respectivos siguientes: (G) glicina, (A) alanina, (V) valina, (L) leucina, (I) isoleucina, (S) serina, (T) treonina, (D) ácido aspártico, (E) ácido glutámico, (N) asparagina, (Q) glutamina, (K) lisina, (R) arginina, (C) cisteína, (M) metionina, (F) fenilalanina, (Y) tirosina, (W) triptófano, (H) histidina, y (P) prolina. Las anotaciones alfabéticas de una letra para designar el ADN son las siguientes: (A) adenina, (C) citosina, (G) guanina y (T) timina.

45 CD98 y anticuerpo monoclonal contra el mismo

CD98, para el que el anticuerpo monoclonal humano y un fragmento funcional del mismo según la presente invención (en lo sucesivo abreviado como "anticuerpo según la presente invención", a menos que se indique lo contrario) presenta una capacidad de unión específica, es una cadena glucoproteica transmembranal de tipo II compuesta de 529 residuos aminoácidos y se encuentra en forma de un heterodímero con una proteína que presenta una actividad de transportador de aminoácidos sobre la membrana celular, tal como se ha indicado anteriormente. Un ejemplo específico preferente de la proteína que presenta una actividad de transportador de aminoácidos es LAT1. Además, en una realización preferente de la presente invención, CD98 es CD98 humano. La estructura primaria de la proteína CD98 humana es conocida (SEC ID n° 66; GenBank/EMBL/DDBJ n° de acceso AB018010) y la de la proteína LAT1 humana también es conocida (SEC ID n° 68; GenBank/EMBL/DDBJ n° de acceso AB018009).

60 El anticuerpo según la presente invención presenta una capacidad de unión específica a CD98 que se derivada de una membrana celular de una célula de cáncer y se encuentra en la forma de un complejo con una proteína que presenta una actividad de transportador de aminoácidos, mientras que el anticuerpo no se une a las células humanas normales, por ejemplo a las células endoteliales vasculares humanas normales, a los monocitos o linfocitos sanguíneos periféricos humanos normales. Entre los ejemplos de las células de cáncer a las que el anticuerpo puede unirse se incluyen las células de cáncer que constituyen el cáncer colorrectal, cáncer pulmonar,

cáncer de mama, cáncer prostático, melanoma, tumor cerebral, linfoma, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, leucemia, linfoma de células T, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer ovárico, cáncer esofágico, cáncer hepático, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer del tracto urinario, cáncer prostático, carcinoma coriónico, 5
cáncer faríngeo, cáncer laríngeo, tumor pelural, arrenoblastoma, hiperplasia endometrial, endometriosis, embrioma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, angioma, angioma cavernoso, hemangioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, neurofibroma, tumor oligodendrogial, meduloblastoma, neuroblastoma, gliocistoma, rabiomioblastoma, glioblastoma, sarcoma osteogénico, leiomioma, sarcoma de tiroides, tumor de Wilms o similar, más concretamente las líneas celulares de cáncer colorrectal (DLD-1, Colo205, SW480, SW620, LOVO, LS180 y HT29), 10
una línea celular de cáncer de pulmón (H226), una línea celular de cáncer de próstata (DU145), una línea celular de melanoma (G361, SKMEL28 y CRL1579), una línea celular de linfoma no de Hodgkin (Ramos), una línea celular de cáncer de vejiga (T24), una línea celular de cáncer de mama (MCF y MDA-MB-231), una línea celular de cáncer pancreático (HS766T), una línea celular de mieloma múltiple (IM19) y una línea celular de leucemia eritroblástica (K562). El anticuerpo según la presente invención resulta ventajoso en términos de la capacidad de unión a dicha 15
diversidad de células de cáncer.

La capacidad de unión específica del anticuerpo según la presente invención a las células de cáncer incrementa la utilidad del anticuerpo según la presente invención. En otras palabras, tal como se indica posteriormente, el anticuerpo según una realización preferente de la presente invención se une ventajosamente sólo a células de 20
cáncer con el fin de inhibir significativamente la incorporación de aminoácidos en las células mediante LAT1, y el anticuerpo según la presente invención puede utilizarse ventajosamente, como agente de reconocimiento, para unirse a otros fármaco y dirigir el fármaco a las células de cáncer.

Además, el anticuerpo según la presente invención presenta una actividad antitumoral. El anticuerpo según una realización preferente de la presente invención presenta la propiedad de inhibir significativamente la incorporación de aminoácidos en las células mediante LAT1. De acuerdo con lo anterior, la actividad antitumoral del anticuerpo según la presente invención se considera que puede atribuirse a que produce un daño específico utilizando un sistema inmunológico mediante ADCC y CDC, así como a que inhibe la incorporación de aminoácidos, tal como se 25
ha indicado anteriormente. En una realización más específica de la presente invención, el anticuerpo según la presente invención inhibe significativamente la incorporación de aminoácidos de las células T24 de la línea celular de cáncer de vejiga. 30

En una realización preferente de la presente invención, el anticuerpo según la presente invención presenta cualquier par de secuencias de (b) SEC ID n° 41 y n° 47, y (c) SEC ID n° 43 y n° 47 indicados posteriormente, como región 35
variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera del mismo. Además, en otra realización de la presente invención, el anticuerpo según la presente invención presenta, como regiones variables, secuencias codificadas por secuencias contenidas en un vector plásmido K3/pCR4 (FERM BP-10552) o C2IgG1/pCR4 (FERM BP-10551), con la condición de que se excluya la secuencia de un vector pCR4. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo según la presente realización se encuentran codificadas por un fragmento BglIII-BsiWI 40
(región variable de cadena ligera) y un fragmento Sall-NheI (región variable de cadena pesada), que se obtienen de cualquiera de los vectores plásmidos indicados anteriormente y no contienen ninguna secuencia de un vector pCR4.

El fragmento funcional del anticuerpo según la presente invención se refiere a un fragmento del anticuerpo de unión específica al antígeno al que se une específicamente el anticuerpo según la presente invención, y más concretamente incluye F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, Fv unido mediante disulfuro, Fv de cadena sencilla (scFv) y polímeros 45
de los mismos, y similares (D.J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, T.J. International Ltd., 1998). Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse mediante un método convencional, por ejemplo la digestión de una molécula de anticuerpo con una proteasa, tal como la papaína, la pepsina o similar, o mediante una técnica de ingeniería genética conocida. 50

La expresión "anticuerpo humano" utilizada en la presente invención se refiere a un anticuerpo que es un producto de expresión de un gen de anticuerpo de origen humano. El anticuerpo humano puede obtenerse mediante la administración de un antígeno en un animal transgénico en el que se ha introducido un locus de anticuerpo humano y que presenta la capacidad de producir anticuerpo de origen humano. Un ejemplo del animal transgénico incluye un 55
ratón y se describe un método para crear un ratón capaz de producir un anticuerpo humano en, por ejemplo, el documento n° WO 02/43478.

El anticuerpo según la presente exposición incluye además un anticuerpo monoclonal compuesto de una cadena pesada y/o una cadena ligera, presentando cada una una secuencia de aminoácidos en la que se han delecionado, 60
sustituido o añadido uno o varios aminoácidos en cada secuencia de aminoácidos de una cadena pesada y/o una cadena ligera que constituye el anticuerpo. Dicha modificación parcial (deleción, sustitución, inserción o adición) de uno o más aminoácidos puede introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo según la presente invención modificando parcialmente la secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos. La

modificación parcial de una secuencia de nucleótidos puede introducirse mediante un método ordinario utilizando mutagénesis específica de sitio conocida (Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 8:15662, 1984; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

5 El anticuerpo según la presente exposición preferentemente puede ser un anticuerpo en el que la isoleucina en la posición 117 de la cadena ligera ha sido sustituida por otro residuo aminoácido, por ejemplo metionina, asparagina, leucina o cisteína. Entre los ejemplos preferentes de dicho anticuerpo se incluyen los que presentan, como región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera, cualquier par de secuencias de (d) SEC ID nº 43 y nº 77, (e) SEC ID nº 43 y nº 79, (f) SEC ID nº 43 y nº 81, y (g) SEC ID nº 43 y nº 83.

10 El anticuerpo según la presente exposición incluye un anticuerpo que presenta cualquier clase y subclase de inmunoglobulina. En una realización preferente de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo de clase y subclase de inmunoglobulina humana, y las clases y subclases preferentes son inmunoglobulina G (IgG), especialmente IgG1, y una cadena ligera preferente es κ .

15 Además, el anticuerpo según la presente invención incluye además un anticuerpo convertido en una subclase diferente mediante modificación mediante ingeniería genética conocida por el experto en la materia (por ejemplo la patente EP nº 0 314 161). En otras palabras, un anticuerpo de una subclase diferente de la subclase original puede obtenerse a partir de un ADN codificante de una región variable del anticuerpo según la presente invención mediante una técnica de ingeniería genética.

20 La ADCC se refiere a una actividad citotóxica que resulta inducida por el reconocimiento de una célula mediante la utilización a una región constante de un anticuerpo mediante un receptor de Fc expresado sobre la superficie de macrófagos, células NK, neutrófilos y similares y la activación de la célula reconocida. Por otra parte, la CDC se refiere a una actividad citotóxica causada por el sistema del complemento activada por la unión de un anticuerpo a un antígeno. Se ha descubierto que la magnitud de estas actividades difiere según la subclase de anticuerpo y la diferencia se basa en una diferencia de estructura de una región constante de un anticuerpo (Charles A. Janeway *et al.*, Immunobiology, Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc., 1997).

25 De acuerdo con lo anterior, por ejemplo un anticuerpo con una fuerza de unión más baja a un receptor de Fc puede obtenerse convirtiendo la subclase del anticuerpo según la presente invención a IgG2 ó a IgG4. Por el contrario, un anticuerpo con una fuerza de unión más alta a un receptor de Fc puede obtenerse convirtiendo la subclase del anticuerpo según la presente invención a IgG1 ó a IgG3. En el caso de que se esperen las actividades de ADCC y de CDC anteriormente indicadas, la subclase de anticuerpo deseablemente es IgG1.

30 En el caso de que un anticuerpo de una subclase diferente se convierta en IgG1, puede prepararse IgG1 mediante, por ejemplo, el aislamiento de sólo una región variable de un hibridoma producto de anticuerpo e introduciendo la región variable en un vector que contiene la región constante de IgG1 humana, por ejemplo el vector N5KG1-Val Lark (IDEC Pharmaceuticals, N5KG1 (patente US nº 6001358)).

35 Además, resulta posible modificar la fuerza de unión a un receptor de Fc mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos de la región constante del anticuerpo según la presente invención mediante ingeniería genética, o mediante la unión de una secuencia de región constante que presente dicha secuencia (ver Janeway C.A. Jr. y Travers P., Immunobiology, tercera edición, Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., 1997) o mediante la modificación de la fuerza de unión a un complemento (ver Mi-Hua Tao *et al.*, J. Exp. Med., 1993). Por ejemplo, puede modificarse una fuerza de unión a un complemento mediante la sustitución de prolina por serina mediante la mutación de la secuencia CCC, codificante de prolina (P) en la posición 331 según el sistema de numeración de la UE (ver Sequences of proteins of immunological interest, publicación del NIH nº 91-3242) de la región constante de la cadena pesada en la secuencia TCC, codificante de serina (S).

40 Por ejemplo, en el caso de que el anticuerpo según la presente invención por sí mismo no presente una actividad inductora de muerte celular, resulta deseable un anticuerpo con actividad antitumoral debido a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante un receptor de Fc. Sin embargo, en el caso de que el anticuerpo por sí mismo presente una actividad inductora de muerte celular, un anticuerpo con una fuerza de unión más baja a un receptor de Fc puede resultar más deseable en algunos casos.

45 Considerando los inmunosupresores, se desea un anticuerpo que no presente actividad de ADCC o actividad de CDC en el caso de la inhibición estérica de únicamente la unión de las células T y las células presentadoras de antígeno, y similares. Además, en el caso de que una actividad de ADCC o una actividad de CDC pueda ser una causa de toxicidad, puede resultar deseable en algunos casos un anticuerpo en el que se evite una actividad causante de toxicidad, mediante la mutación de la región Fc o la modificación de la subclase.

60

Considerando lo anterior, el anticuerpo según la presente invención puede ser un anticuerpo que puede dañar específicamente las células de cáncer mediante ADCC o CDC mediante la conversión en otra subclase mediante ingeniería genética, en caso necesario.

5 El anticuerpo según la presente invención reconoce un epítipo constituido por como mínimo 8 residuos aminoácidos consecutivos o no consecutivos en la secuencia de aminoácidos de CD98 humano (SEC ID nº 66). El anticuerpo según la presente invención presenta una capacidad de unión a parte de la región de los aminoácidos 371 a 529 ó parte de la región de los aminoácidos 1 a 371 de la secuencia de aminoácidos de CD98 humano.

10 En la presente memoria se describe un anticuerpo con reactividad cruzada con CD98 humano y CD98 de mono. Se considera que dicho anticuerpo reconoce una estructura de epítipo igual o muy similar a la de CD98 humano y CD98 de mono, y presenta la ventaja de que pueden llevarse a cabo diversos ensayos en monos como animales experimentales antes de los estudios clínicos en el ser humano.

15 Preparación de anticuerpos de CD98

El anticuerpo según la presente invención puede producirse mediante, por ejemplo, el método siguiente. La inmunización se lleva a cabo mediante inmunización de mamíferos no humanos, tales como ratones, conejos, cabras, caballos y similares con CD98 humano/LAT1 humano o una parte de los mismos, o un conjugado de los mismos con una sustancia apropiada (por ejemplo albúmina de suero bovino) para incrementar la antigenicidad de un antígeno, o con células sobre la superficie de las cuales se expresa CD98 humano/LAT1 humano en gran cantidad, en combinación con un inmunoestimulador (adyuvante de Freund, etc.), en caso necesario, o mediante la administración de un vector de expresión incorporado con CD98 humano/LAT1 humano a los mamíferos no humanos. El anticuerpo según la presente invención puede obtenerse mediante la preparación de un hibridoma a partir de células productoras de anticuerpos obtenidas de un animal inmunizado y células de mieloma que no presentan capacidad productora de autoanticuerpos, la clonación del hibridoma y la selección de un clon que produce un anticuerpo monoclonal que muestra una afinidad específica para el antígeno utilizado para la inmunización.

30 El método para preparar el anticuerpo según la presente invención se describe más específicamente en detalle posteriormente, aunque el método para preparar el anticuerpo no se encuentra limitado al mismo y también pueden utilizarse, por ejemplo, células productoras de anticuerpos diferentes de las células de bazo.

35 Como antígeno puede utilizarse un transformante que se obtiene mediante la incorporación de un ADN codificante de CD98 en un vector de expresión para células animales y la introducción del vector de expresión en las células animales.

40 Debido a que CD98 forma un heterodímero con LAT1 sobre la superficie celular de muchas células de cáncer, se espera obtener un anticuerpo que inhibe la incorporación de aminoácidos por LAT1 mediante la incorporación de un ADN codificante de LAT1 en un vector de expresión de manera similar y utilizando un transformante en el que CD98 y LAT1 se coexpresan como antígeno.

45 Como vector de expresión para células animales pueden utilizarse, por ejemplo, vectores tales como pEGF-N1 (fabricado por Becton Dickinson Bioscience Clontech). Puede prepararse un vector para introducir un gen deseado mediante el corte de un sitio de inserción con un enzima de restricción apropiado y uniendo el CD98 humano o LAT1 humano cortado por el mismo enzima. El vector de expresión preparado puede introducirse en las células, por ejemplo en células L929 (American Type Culture Collection nº CCL-1) como huésped para preparar células de expresión elevada de CD98 humano y LAT1 humano.

50 Los métodos para introducir un gen en un huésped son conocidos y entre ellos se incluyen, por ejemplo, cualesquiera métodos (por ejemplo un método que utiliza un ión calcio, un método de electroporación, un método de esferoplastos, el método de acetato de litio, el método del fosfato cálcico, un método de lipofección y similares).

55 Las células transformadas preparadas de esta manera pueden utilizarse como inmunógeno para preparar un anticuerpo de CD98. El vector de expresión mismo también puede utilizarse como inmunógeno.

60 Puede producirse CD98 humano utilizando apropiadamente un método conocido de la técnica, tal como una técnica de recombinación genética, así como un método de síntesis química y un método de cultivo celular basado en la secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos conocida de CD98. La proteína CD98 humano obtenida de esta manera también puede utilizarse como antígeno para preparar un anticuerpo de CD98. También puede producirse una secuencia parcial de CD98 humano mediante una técnica de recombinación genética o una síntesis química según un método conocido de la técnica descrito posteriormente, o puede producirse cortando CD98 humano apropiadamente mediante la utilización de un enzima de degradación proteica, o similar.

El antígeno obtenido tal como se ha indicado anteriormente puede utilizarse para la inmunización tal como se indica posteriormente. Concretamente, el antígeno preparado se mezcla con una sustancia apropiada para incrementar la antigenicidad (por ejemplo albúmina de suero bovino y similares) y un inmunoadyuvante (adyuvante de Freund completo o incompleto, y similares), según se requiera, y se utiliza para la inmunización de un mamífero no humano, tal como un ratón, conejo, cabra o caballo. Además, preferentemente el anticuerpo según la presente invención puede obtenerse como anticuerpo humano utilizando un animal no humano que presenta un gen de anticuerpo humano no reorganizado y produce un anticuerpo humano específico para el antígeno mediante inmunización. En este caso, entre los ejemplos de los animales productores del anticuerpo humano se incluyen ratones transgénicos productores de anticuerpo humano descritos en la literatura de Tomizuka *et al.* (Tomizuka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 97:722, 2000).

Puede prepararse un hibridoma secretor de un anticuerpo monoclonal mediante el método de Kohler y Milstein (Nature 256:495-497, 1975) o según el método. En otras palabras, se prepara un hibridoma mediante fusión celular entre las células productoras de anticuerpos contenidas en el bazo, los nódulos linfáticos, la médula ósea, las amígdalas, y similares, preferentemente contenidas en los nódulos linfáticos o el bazo, obtenidas de un animal inmunizado tal como se ha indicado anteriormente, y células de mieloma que se derivan preferentemente de un mamífero, tal como un ratón, una rata, un cobaya, un hámster, un conejo, un ser humano o similar e incapaz de producir cualquier autoanticuerpo. La fusión celular puede llevarse a cabo mediante la mezcla de células productoras de anticuerpos con células de mieloma en una solución a alta concentración de un polímero, tal como polietilenglicol (por ejemplo un peso molecular de entre 1.500 y 6.000), habitualmente a una temperatura de entre 30°C y 40°C, durante aproximadamente 1 a 10 minutos. Puede cribarse un clon de hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal mediante el cultivo de un hibridoma sobre, por ejemplo, una placa de microtitulación, y midiendo la reactividad de un sobrenadante de cultivo de pocillos en los que se cultiva el hibridoma respecto a un antígeno de inmunización utilizando un método inmunológico, tal como un inmunoensayo enzimático (por ejemplo ELISA), un radioinmunoensayo o un método de anticuerpos fluorescentes.

Puede producirse un anticuerpo monoclonal a partir de un hibridoma mediante el cultivo del hibridoma *in vitro* y aislando después los anticuerpos monoclonales a partir de un sobrenadante de cultivo. También puede producirse un anticuerpo monoclonal con un hibridoma mediante el cultivo del mismo en ascites o similar de un ratón, rata, cobaya, hámster, conejo o similar *in vivo*, aislando el anticuerpo monoclonal a partir del ascites. Además, puede prepararse un anticuerpo recombinante mediante una técnica de recombinación genética mediante la clonación de un gen codificante de un anticuerpo monoclonal a partir de células productoras de anticuerpos, tales como un hibridoma y similares, e incorporando el gen en un vector apropiado, introduciendo el vector en un huésped (por ejemplo células de una línea celular de mamífero, tal como células de ovario de hámster chino (CHO) y similares, *E. coli*, células de levadura, células de insecto, células vegetales y otras (P.J. Delves, Antibody production essential techniques, Wiley; P. Shepherd y C. Dean, Monoclonal Antibodies, Oxford University Press, 1997; J.W. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 1993, ACADEMIC PRESS). Además, mediante la preparación de un bovino, cabra, oveja o porcino transgénico en el que se ha incorporado un gen de un anticuerpo diana en un gen endógeno utilizando una técnica de producción de animal transgénico, puede obtenerse una gran cantidad de anticuerpo monoclonal derivado del gen del anticuerpo de la leche del animal transgénico. En el caso de que se cultive un hibridoma *in vitro*, el hibridoma se cultiva, se mantiene y se almacena dependiendo de diversas condiciones, tales como las propiedades de una especie celular que debe cultivarse, los objetivos del estudio y los métodos de cultivo y similares, y el cultivo puede llevarse a cabo utilizando un medio nutritivo conocido o cualesquiera medios nutritivos inducidos y preparados a partir de un medio básico conocido, los cuales se utilizan para producir un anticuerpo monoclonal en el sobrenadante del cultivo.

El anticuerpo monoclonal producido puede purificarse mediante un método conocido de la técnica, por ejemplo mediante una combinación apropiada de cromatografía utilizando una columna de proteína A, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, precipitación salina con sulfato amónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad y similares.

Utilización farmacéutica del anticuerpo

El anticuerpo según la presente invención puede formar un complejo que puede utilizarse con el fin de tratamiento, tal como la administración de fármaco en células de cáncer, la terapia con misiles y similares, mediante la conjugación del anticuerpo con un agente terapéutico, debido a la capacidad de unión específica a CD98 que se deriva de la membrana celular de las células de cáncer y se encuentra en forma de un complejo con una proteína que presenta una actividad de transportador de aminoácidos.

Entre los ejemplos del agente terapéutico que debe conjugarse con el anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, radionucleidos tal como yodo (^{131}I , yodo: ^{125}I), itrio (^{90}Y), indio (^{111}In), tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) y similares (J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 1993, Academic

Press); toxinas bacterianas, tales como la exotoxina de *Pseudomonas*, la toxina diftérica y la ricina; y agentes quimioterapéuticos tales como el metotrexato, la mitomicina, la caliqueamicina y similares (D. J. King, *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*, 1998, T.J. International Ltd., M. L. Grossbard, *Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer*, 1998, Marcel Dekker Inc.), preferentemente un compuesto de selenio que induce una producción de radical.

Puede unirse un anticuerpo a un agente terapéutico mediante enlace covalente o enlace no covalente (por ejemplo enlace iónico). Por ejemplo, el complejo de la presente invención puede obtenerse utilizando un grupo reactivo (por ejemplo un grupo amino, un grupo carboxilo o un grupo hidroxilo) en una molécula o un grupo de coordinación, tras la unión a un grupo más reactivo o convertirse en un grupo reactivo, según se requiera, poniendo en contacto un anticuerpo con un agente terapéutico que presenta un grupo funcional capaz de reaccionar con el grupo reactivo formando un enlace (en el caso de una toxina bacteriana o un agente quimioterapéutico) o un grupo iónico capaz de formar un complejo con el enlace de coordinación (en el caso de un radionucleido). Alternativamente, también puede utilizarse un sistema de biotina-avidina para la formación de complejo.

En el caso de que el agente terapéutico sea una proteína o un péptido, puede producirse una proteína de fusión del anticuerpo y la proteína o péptido mediante una técnica de ingeniería genética.

Además, debido a que el anticuerpo según la presente invención presenta una actividad antitumoral, puede utilizarse el anticuerpo mismo como agente antitumoral. Además, el anticuerpo puede utilizarse como ingrediente activo de una composición farmacéutica, especialmente un agente preventivo o terapéutico para tumores.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el anticuerpo o la composición farmacéutica según la presente invención puede aplicarse al tratamiento o la prevención de diversas enfermedades o síntomas que pueden atribuirse a las células que expresan CD98 humano/LAT1 humano. Entre los ejemplos de la enfermedad o síntomas se incluyen diversos tumores malignos, y entre los ejemplos del tumor se incluyen cáncer colorrectal, cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer prostático, melanoma, tumor cerebral, linfoma, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, leucemia, linfoma de células T, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer ovárico, cáncer esofágico, cáncer hepático, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer del tracto urinario, cáncer prostático, carcinoma coriónico, cáncer faríngeo, cáncer laríngeo, tumor pleural, arrenoblastoma, hiperplasia endometrial, endometriosis, embrioma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, angioma, angioma cavernoso, hemangioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, neurofibroma, tumor oligodendrial, meduloblastoma, neuroblastoma, gliocistoma, rabdomioblastoma, glioblastoma, sarcoma osteogénico, leiomiomasarcoma, sarcoma del tiroides, tumor de Wilms y similares. El anticuerpo según la presente invención puede aplicarse no sólo en un tumor sino en múltiples tumores simultáneos. El anticuerpo monoclonal humano según la presente invención puede aplicarse para la prolongación de la vida de un paciente con cáncer local primario. Además, se permite que la composición farmacéutica según la presente invención actúe selectivamente sobre células inmunocompetentes que expresan CD98.

Se proporciona preferentemente como composición farmacéutica un medicamento que contiene el anticuerpo según la presente invención o el anticuerpo unido a un agente terapéutico.

Dicha composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico y se formula en diversas formas para la administración oral o parenteral. La cantidad terapéuticamente eficaz utilizada en la presente memoria se refiere a una cantidad que muestra un efecto terapéutico sobre un síntoma dado en un régimen de dosificación dado.

La composición según la presente invención puede comprender, además del anticuerpo, uno o más aditivos farmacéuticos fisiológicamente aceptables, por ejemplo diluyentes, conservantes, solubilizadores, emulsionantes, adyuvantes, antioxidantes, agentes tonificadores, excipientes y portadores. Además, la composición puede ser una mezcla con otros fármacos, tales como otros anticuerpos o antibióticos.

Entre los ejemplos del portador apropiado se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, solución salina fisiológica, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución de glucosa y solución salina fisiológica tamponada. Puede contener estabilizadores, tales como aminoácidos, azúcares, surfactantes y similares, e inhibidores de la adsorción superficial que son conocidos de la técnica.

Como forma de la formulación puede seleccionarse una formulación dependiendo del objetivo del tratamiento y el régimen terapéutico a partir de formulaciones, incluyendo las formulaciones liofilizadas (que pueden utilizarse tras la reconstitución mediante la adición de una solución acuosa tamponada tal como se ha indicado anteriormente), formulaciones de liberación sostenida, formulaciones entéricas, inyecciones, infusiones por goteo y similares.

Puede determinarse una vía de administración de manera apropiada, y puede considerarse una vía oral, así como una vía parenteral, incluyendo las administraciones intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal de fármaco. Alternativamente, también puede llevarse a cabo un método en el que la composición según la presente invención se pone en contacto directamente con un sitio afectado de un paciente.

La dosis puede determinarse apropiadamente mediante estudios animales y estudios clínicos, aunque en general debería determinarse considerando la condición o severidad, edad, peso corporal, sexo y similares del paciente. En general, para la administración oral, la dosis es de entre aproximadamente 0,01 y 1.000 mg/día para el adulto, que pueden administrarse una vez al día o divididas en varias veces al día. Para la administración parenteral, pueden administrarse aproximadamente 0,01 a 1.000 mg/dosis mediante inyección subcutánea, inyección intramuscular o inyección intravenosa.

La presente invención comprende un método preventivo o terapéutico de las enfermedades indicadas anteriormente utilizando el anticuerpo o composición farmacéutica según la presente invención, y comprende además la utilización del anticuerpo según la presente invención para la preparación de un agente preventivo o terapéutico para las enfermedades indicadas anteriormente.

En una realización preferente de la presente invención, el anticuerpo según la presente invención se utiliza como ampolla que contiene una solución o suspensión estéril obtenida mediante la disolución del anticuerpo en agua o en una solución farmacológicamente aceptable. Además, puede rellenarse una ampolla con una formulación de polvos estériles (preferentemente se liofiliza una molécula de la presente invención) y reconstituirse con una solución farmacológicamente aceptable en el momento de la utilización.

Ejemplos

La presente invención se ilustra en mayor detalle mediante los Ejemplos siguientes, aunque la presente invención no se encuentra limitada a las realizaciones descritas en dichos Ejemplos.

Ejemplo 1: preparación de vector de expresión de CD98 humano o LAT1 humano

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los vectores plásmidos pcDNA3.1-hCD98 y pcDNA3.1-hLAT1 que contienen ADN de CD98 humano (CD98_h, GenBank/EMBL/DDBJ, nº de acceso AB018010, SEC ID nº 65) y LAT1 humano (LAT1_h, GenBank/EMBL/DDBJ nº de acceso AB018009, SEC ID nº 67), respectivamente, a modo de moldes. Con el fin de añadir la secuencia de EcoRI al extremo 5' del ADNc de CD98 humano de longitud completa y la secuencia de NotI y un codón de terminación al extremo 3', se utilizaron los cebadores 5'-CCG GAA TTC CCA CCA TGA GCC AGG ACA CCG AGG TGG ATA TGA3' (SEC ID nº 59) y 5'-AAG GAA AAA AGC GGC CGC TCA TCA GGC CGC GTA GGG GAA GCG GAG CAG CAG 3' (SEC ID nº 60) y como moldes se utilizó la ADN polimerasa KOD-Plus (fabricada por Toyobo) y ADNc de CD98_h (aproximadamente 20 ng), para llevar a cabo 30 ciclos de PCR a 94°C durante 15 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 1 minuto 30 segundos. La secuencia de CD98_h modificada se aisló como fragmento EcoRI-NotI y se ligó en un vector pTracer-EF/Bsd (fabricado por Invitrogen) que había sido cortado con el mismo enzima. El plásmido obtenido se utilizó como molde y se utilizó el cebador CD98 v2 U (5'-AGT CTC TTG CAA TCG GCT AAG AAG AGC ATC CGT GTC ATT CTG -3' (SEC ID nº 61)) y el cebador CD98 v2 L (5'-CAG AAT GAC ACG GAT GCT CTT CTT CTT AGC CGA TTG CAA GAG ACT -3' (SEC ID nº se utilizaron para cambiar A de las posiciones 591 y 594 del ADN de CD98_h (posiciones 702 y 705 en SEC ID nº 65) a G. Se preparó un fragmento EcoRI-CD98_h-NotI a partir del plásmido obtenido y se ligó con el vector pEF6myc-His/Bsd (Invitrogen) que había sido cortado con el mismo enzima. El plásmido obtenido se denominó pEF6/CD98_h.

De una manera similar, con el fin de añadir la secuencia de EcoRI al extremo 5' del ADNc de LAT1 humano de longitud completa y la secuencia de KpnI al extremo 3', se utilizaron los cebadores 5'-CCG GAA TTC CCA CCA TGG CGG GTG CGG GCC CGA AGC GGC-3' (SEC ID nº 63) y 5'-CGG GGT ACC GTC TCC TGG GGG ACC ACC TGC ATG AGC TTC-3' (SEC ID nº 64) y como moldes se utilizó la ADN polimerasa KOD-Plus y ADNc de LAT1_h (aproximadamente 20 ng), para llevar a cabo 30 ciclos de PCR a 94°C durante 15 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 1 minuto 30 segundos. La secuencia de LAT1_h modificada se aisló como fragmento EcoRI-KpnI y se ligó en un vector pEGFP-N1 (fabricado por Clontech) que había sido cortado con el mismo enzima. Además, se aisló el plásmido obtenido como fragmento EcoRI-NotI y se ligó en un vector pEF1V5His/Neo (fabricado por Invitrogen) que había sido cortado con el mismo enzima. El plásmido obtenido se denominó pEF1/LAT1_h-EGFP.

Ejemplo 2: preparación de células expresantes de CD98_h/LAT1_h

Se prepararon células expresantes de CD98_h/LAT1_h mediante la introducción de los vectores de expresión pEF6/CD98_h y pEF1/LAT1_h-EGFP (LAT1_h-E) preparados en el Ejemplo 1 en células Colon 26 (CT26) y en

células L929 (American Type Culture Collection nº CCL-1) utilizando lipofectamina y reactivo Plus fabricado por Invitrogen. Se llevó a cabo la introducción génica según el método descrito en el manual. Las células transgénicas se cultivaron en una placa de cultivo celular (placa de 6 pocillos, fabricada por Becton Dickinson) a 37°C en gas carbonato al 5% durante 24 horas y después se cultivaron en un medio de cultivo que contenía blasticidina (5 mg/ml) y G418 (500 mg/ml) en el caso de la línea celular CT26 y un medio de cultivo que contenía blasticidina (5 mg/ml) y G418 (1 mg/ml) en el caso de la línea celular L929 durante 3 días adicionales. A continuación, se separaron las células positivas para LAT1_h-E y CD98 mediante FACS Vantage utilizando anticuerpo de ratón anti-CD98 humano marcado fluorescentemente con RPE (Becton Dickinson, nº de cat. 556076). Se prepararon células L929 expresantes de CD98_h o células L929 expresantes de LAT1_h-E de una manera similar.

Ejemplo 3: preparación de ratones productores de anticuerpo humano

Los ratones utilizados para la inmunización presentaban un fondo genético homogigótico para la interrupción de tanto la cadena pesada de Ig endógeno como la cadena ligera κ y conservaban un fragmento del cromosoma 14 (SC20) que contenía un locus de cadena pesada de Ig humano y un transgén de cadena κ de Ig humana (KCo5) simultáneamente. Estos ratones se prepararon cruzando un ratón de línea A que presentaba un locus de cadena pesada de Ig humana y un ratón de línea B que presentaba un transgén de cadena κ de Ig humana. Los ratones de línea A eran homogigóticos para la interrupción de tanto la cadena pesada de Ig endógeno y la cadena ligera κ y conservaban un fragmento del cromosoma 14 (SC20) que era transmisible a la progenie, y se describen, por ejemplo, en el artículo de Tomizuka *et al.* (Tomizuka *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA Vol 97: 722, 2000). Los ratones de línea B eran ratones transgénicos que eran homogigóticos para la interrupción de tanto la cadena pesada de Ig endógena y la cadena ligera κ y conservaban un transgén de la cadena κ de Ig (KCo5) y se describen, por ejemplo, en el artículo de Fishwild *et al.* (Nat Biotechnol. vol.14:845, 1996).

La progenie de ratones obtenida mediante el cruce de un ratón macho de línea A y un ratón hembra de línea B o un ratón hembra de línea A y un ratón macho de línea B se analizó mediante el método descrito en el artículo de Tomizuka (Tomizuka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 97: 722, 2000) y se cribaron los individuos (ratones productores de anticuerpos humanos) para los que se había detectado simultáneamente en el suero la cadena pesada de Ig humana y la cadena ligera κ (Ishida y Lonberg, IBC's, 11th Antibody Engineering, resumen, 2000; Ishida I. *et al.*, Cloning & Stem Cells 4:85-96, 2002) y se utilizaron en los experimentos de inmunización posteriores. En los experimentos de inmunización también se utilizaron ratones y similares con fondos genéticos alterados de los ratones anteriormente indicados (Ishida Isao, Jikken Igaku 20:6846851, 2002).

Ejemplo 4: preparación de anticuerpos monoclonales humanos

Se prepararon anticuerpos monoclonales según un método general descrito en, por ejemplo, "Introduction of Experimental Protocols for Monoclonal Antibody" (Monoclonal Antibody, Jikken Sosa Nyumon, escrito por Tamie ANDO *et al.*, KODANSHA, 1991).

Como inmunógeno se utilizaron CD98_h/LAT1_h, las células CT26 expresantes de CD98_H/LAT1_h-E preparadas en el Ejemplo 2 y la línea celular de cáncer colorrectal humano Col205 para la que se había confirmado la expresión de CD98_h.

Como animales para la inmunización se utilizaron ratones productores de anticuerpos humanos productores de inmunoglobulina humana que habían sido preparados en el Ejemplo 3.

Al utilizar células CT26 expresantes de CD98_h/LAT1_h-E, se mezclaron 5×10^6 células con adyuvante RIBI (fabricado por Corixa) y se administraron por vía intraperitoneal para la inmunización primaria. Los días 7 y 24 después de la inmunización primaria se administraron 5×10^6 células/ratón por vía intraperitoneal para la inmunización de refuerzo. Las células se inmunizaron adicionalmente de la misma manera 3 días antes de obtener las células de bazo indicadas posteriormente.

Al utilizar células Colo205, se administraron por vía intraperitoneal 5×10^6 células para la inmunización primaria. El día 14 después de la inmunización primaria, se administraron por vía intraperitoneal 5×10^6 células/ratón para la inmunización de refuerzo y se obtuvieron las células de bazo indicadas posteriormente 3 días después.

Se obtuvo el bazo quirúrgicamente de los ratones inmunizados y las células de bazo recuperadas se mezclaron con células SP2/0 de mieloma de ratón (ATCC nº CRL1581) en una proporción de 5:1 y las células se fusionaron utilizando polietilenglicol-1500 (fabricado por Roche) como agente de fusión para preparar un gran número de hibridomas. Los hibridomas se cultivaron en un medio DMEM que contenía HAT (fabricado por Gibco) que contenía suero de feto bovino al 10% (FCS) e hipoxantina (H), aminopterina (A) y timidina (T) para el cribado. Se obtuvieron clones individuales utilizando un medio DMEM que contenía HT mediante dilución limitante. Se utilizó para el cultivo una placa de microtitulación de 96 pocillos (fabricada por Becton Dickinson). La selección (cribado) para clones de

hibridoma productores de un anticuerpo monoclonal humano deseado y la caracterización de los anticuerpos monoclonales humanos producidos por los hibridomas respectivos se llevó a cabo mediante la medición con un separador celular activado por fluorescencia (FACS) indicado posteriormente.

5 El cribado para hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos se llevó a cabo tal como se indica posteriormente. En otras palabras, se obtuvieron 200 ó más hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos que contenían una cadena μ de inmunoglobulina humana (Igm_h), una cadena γ (Igy_h) y una cadena ligera κ de inmunoglobulina humana (Igk_h) y presentaban una reactividad específica para las células CT26 expresantes de CD98_h/LAT1_h-E mediante el análisis FACS descrito posteriormente.

10 En los Ejemplos en la presente memoria, los clones de hibridoma que produjeron cada uno de los anticuerpos monoclonales humanos se denominaron utilizando los símbolos en las Tablas y figuras que muestran los resultados. Los clones de hibridoma siguientes representan clones individuales: 4-35-14 (C2), 4-32-9 (K3), 7-95-8, 10-60-7, 3-69-6, 5-80-1 (para los clones anteriormente indicados, el inmunógeno son las células CT26 expresantes de CD98_h/LAT1_h-E) y 1-40-1 (para el clon, el inmunógeno son las células Colo205).

15 Ejemplo 5: identificación de subclases de cada uno de los anticuerpos monoclonales

20 La subclase de cada uno de los anticuerpos monoclonales obtenidos en el Ejemplo 4 se identificó mediante análisis de FACS. Se suspendieron 2×10^6 /ml células Colo205 en un tampón de tinción (TT) de PBS que contenía EDTA 1 mM, Na₃N al 0,1% y FCS al 5%. La suspensión celular se dispuso en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (fabricada por Becton Dickinson) a razón de 50 ml/pocillo. Además, el sobrenadante de cultivo (50 μ l) del hibridoma cultivado en el Ejemplo 4 se añadió a la misma y la mezcla se agitó, se dejó que reaccionase a temperatura de hielo durante 30 minutos y después de centrifugó (2.000 rpm, 4°C, 2 minutos) para eliminar el sobrenadante. Tras lavar una vez los pellets con 100 μ l/pocillo de TT, se añadió a los mismos un anticuerpo Igm F(ab')₂ de conejo anti-humano marcado fluorescentemente con FITC (fabricado por Dako Cytomation) diluido 50 veces con TT o un anticuerpo Igy F(ab')₂ de cabra antihumano marcado fluorescentemente con RPE (fabricado por SouthernBiotech) diluido 200 veces con TT, o un anticuerpo Igk F(ab')₂ de conejo antihumano marcado fluorescentemente con RPE (fabricado por Dako Cytomation) diluido 200 veces con TT, y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura de hielo durante 30 minutos. Tras lavar una vez con TT, las células se suspendieron en 300 ml de TT y se midió una intensidad de fluorescencia indicativa de la unión de anticuerpo, con un FACS (FACSCan, fabricado por Becton Dickinson). Los resultados obtenidos de las partes de los anticuerpos se muestran en la Tabla 1. Para C2, la cadena pesada era cadena μ y la cadena ligera era cadena κ , y para la totalidad de K3, 3-69-6, 7-95-8, 10-60-7, 1-40-1 y 5-80-1, la cadena pesada era cadena γ y la cadena ligera era cadena κ .

35 [Tabla 1]

Tabla 1: Subclase de anticuerpos

Clon	Cadena ligera	Cadena pesada
K3	K humana	γ humana
C2	K humana	μ humana
1-40-1	K humana	γ humana
3-69-6	K humana	γ humana
7-95-8	K humana	γ humana
10-60-7	K humana	γ humana
5-80-1	K humana	γ humana

40 Ejemplo 6: preparación de genes codificantes de anticuerpos monoclonales y construcción de vectores de expresión de anticuerpo recombinante

La clonación de los genes de los anticuerpos respectivos C2, K3, 7-95-8, 10-60-7, 3-69-6 y 1-40-1, y la construcción de vectores de expresión se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos descritos posteriormente.

45 (1) Clonación de ADNc de genes de anticuerpo y preparación de vectores de expresión

Se cultivó el hibridoma en un medio DMEM (fabricado por Gibco) que contenía FCS al 10%, las células se recogieron mediante centrifugación y después se añadió ISOGEN (fabricado por Nippon Gene) al ARN total extraído siguiendo el manual de instrucciones. La clonación de la región variable de los ADNc de anticuerpo se llevó a cabo utilizando un kit de amplificación de ADNc SMART RACE (fabricado por Clontech) siguiendo el manual de instrucciones adjunto.

Se preparó el ADNc de primera cadena utilizando 5 μ g del ARN total como molde.

(a) Síntesis del ADNc de primera cadena

5 Una solución de reacción que presentaba una composición de 5 µg/3 µl del ARN total, 1 ml de 5'CDS y 1 ml de oligo SMART se incubó a 70°C durante 2 minutos, después se añadieron 2 ml de tampón 5x, 1 ml de DTT, 1 ml de mezcla de dNTP y 1 ml de Superscript II y después la mezcla resultante se incubó a 42°C durante 15 horas. Tras añadir 100 ml de tampón de tricina, la mezcla resultante se incubó a 72°C durante 7 minutos, obteniendo ADNc de primera cadena.

10 (b) Amplificación mediante PCR de genes de cadena pesada y genes de cadena ligera y construcción de vectores de expresión de anticuerpo recombinante

Se utilizó ADNc KOD-Plus de Toyobo para la amplificación del ADNc

15 Se preparó una solución de reacción que presentaba una composición de 15 µl de ADNc, 5 µl de tampón KOD-Plus 10x, 5 µl de mezcla de dNTP, 1 µl de KOD-Plus, 3 ml de MgSO₄ 25 mM, cebador 1 y cebador 2, en un volumen final de 50 µl con agua doblemente destilada y se sometió a PCR.

20 Con respecto a K3, 1-40-1, 3-69-6 y C2, se muestran específicamente ejemplos experimentales a continuación.

K3

25 Para la amplificación de la cadena ligera, se utilizó AMP y un cebador hk-2 (5'-GTT GAA GCT CTT TGT GAC GGG CGA GC-3' (SEC ID nº 1)) y se repitió 5 veces un ciclo de 94°C durante 5 segundos y 72°C durante 3 minutos, seguido de la repetición 5 veces de un ciclo de 94°C durante 5 segundos, 70°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos, y seguido además de la repetición 25 veces de un ciclo de 94°C durante 5 segundos, 68°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos. Además, 1 µl de una solución diluida 5 veces de dicha solución de reacción se utilizó como molde, y se utilizó NUMP y un cebador hk5 (5'-AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CCA GAT TTC-3' (SEC ID nº 2)) y se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Esta solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% y el producto de PCR amplificado se purificó con un kit de extracción de gel QIA quick (fabricado por Qiagen). El producto de PCR purificado se ligó en un vector pCR4Blunt-TOPO (fabricado por Invitrogen) para la subclonación según el manual de instrucciones adjunto. A continuación se utilizó T3 (5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3' (SEC ID nº 3)) y hk5 como cebadores para determinar la secuencia de nucleótidos. Basándose en la información de secuencia, se sintetizó DNPL15Bglp (5'-AGA GAG AGA GAT CTC TCA CCA TGG AAG CCC CAG CTC AGC TTC TCT-3' (SEC ID nº 4)). El gen de cadena ligera subclonado utilizando el vector pCR4Blunt-TOPO se utilizó como molde y se utilizó DNPL15Bglp y un cebador 202LR (5'-AGA GAG AGA GCG TAC GTT TAA TCT CCA GTC GTG TCC CTT GGC-3' (SEC ID nº 5)) y se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Esta solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% y se purificó un fragmento de aproximadamente 400 pb con un kit de extracción de gel QIA quick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADNc de cadena ligera amplificado se digirió con BglII y BsiWI y el producto digerido se introdujo en un vector N5KG1-Val Lark (IDEC Pharmaceuticals, un vector modificado de N5KG1 (patente US nº 6001358)) que había sido cortado con los mismos enzimas. El vector obtenido de esta manera se denominó N5KG1-Val K3L.

45 Para la amplificación de la cadena pesada, se utilizó UMP y un cebador IgG1p (5'-TCT TGT CCA CCT TGG TGT TGC TGG GCT TGT G-3' (SEC ID nº 6)) y se repitió 5 veces un ciclo de 94°C durante 5 segundos y 72°C durante 3 minutos, seguido de la repetición 5 veces de un ciclo de 94°C durante 5 segundos, 70°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos, y seguido además de la repetición 25 veces de un ciclo de 94°C durante 5 segundos, 68°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos. Además, 1 µl de una solución diluida 5 veces de dicha solución de reacción se utilizó como molde, y se utilizó NUMP y IgG2p (5'-TGC ACG CCG CTG GTC AGG GCG CCT GAG TTC C-3' (SEC ID nº 7)) y se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El producto de PCR purificado se ligó al vector pCR4Blunt-TOPO para la subclonación. A continuación, se utilizaron T3 y hh2 (5'-GCT GGA GGG CAC GGT CAC CAC GCT G-3' (SEC ID nº 8)) como cebadores para determinar la secuencia de nucleótidos. Basándose en la información de secuencia se sintetizó K3HcSall (5'-AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGG GGT CAA CCG CCA TCC TCG CCC TCC TC-3' (SEC ID nº 9)). El gen de cadena pesada subclonado utilizando el vector pCR4Blunt-TOPO se utilizó como molde; se utilizaron K3HcSall y F24HNhe (5'-AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CGG TGA CCA GGG TTC-3' (SEC ID nº 10)) y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% y se purificó un fragmento de aproximadamente 450 pb mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El fragmento de ADNc de cadena pesada amplificado se digirió con Sall y NheI y el producto digerido se introdujo en N5KG1-Val K3L que había sido cortado con los mismos enzimas. Se determinó la secuencia de nucleótidos de ADN

de la parte insertada y se confirmó que la secuencia que había sido amplificada por PCR e insertada era idéntica a la secuencia génica utilizada como molde. El vector obtenido se denominó N5KG1-Val K3IgG1. Si el anticuerpo K3 recombinante obtenido mediante la introducción de N5KG1-Val K3IgG1 en células FreeStyle293 indicadas posteriormente era idéntico o no al anticuerpo derivado de un hibridoma de K3 se confirmó mediante la determinación de la actividad de unión a la línea celular expresante de CD98_h/LAT1_h.

1-40-1

Para la amplificación de la cadena pesada se utilizó UMP y un cebador IgG1p y se repitió 5 veces un ciclo de 94°C durante 5 segundos y 72°C durante 3 minutos, seguido de la repetición 5 veces de un ciclo de 94°C durante 5 segundos, 70°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos; además se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 5 segundos, 68°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos. Además, se utilizó 1 ml de una solución diluida 5 veces de dicha solución de reacción a modo de molde; se utilizó NMP y un cebador IgG2p y se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El producto de PCR purificado se ligó al vector pCR4Blunt-TOPO para la subclonación. A continuación se utilizó T3 y hh2 como cebadores para determinar la secuencia de nucleótidos. Basándose en la información de secuencia se sintetizó 205HP5Sall (5'-AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT GGG TTC-3' (SEC ID n° 11)) y el gen de cadena pesada se subclonó utilizando el vector pCR4Blunt-TOPO a modo de molde; se utilizó 205HP5Sall y el cebador F24Hnhe y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% y se purificó un fragmento de aproximadamente 450 pb mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El fragmento de ADNc de cadena pesada amplificado se digirió con Sall y NheI y el producto digerido se introdujo en N5KG1-Val Lark que había sido cortado con los mismos enzimas. El vector obtenido se denominó N5KG1-Val 1-40-1H.

Para la amplificación de la cadena ligera se utilizó UMP y el cebador hk-2 y se repitió 5 veces un ciclo de 94°C durante 5 segundos y 72°C durante 3 minutos, seguido de la repetición 5 veces de un ciclo de 94°C durante 5 segundos, 70°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos; además se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 5 segundos, 68°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos. Además, se utilizó 1 ml de una solución diluida 5 veces de dicha solución de reacción a modo de molde; se utilizó NMP y el cebador hk5 y se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El producto de PCR purificado se ligó al vector pCR4Blunt-TOPO para la subclonación. A continuación se utilizó T3 y hk5 como cebadores para determinar la secuencia de nucleótidos. Basándose en la información de secuencia se sintetizó A27RN202 (5'-AGA GAG AGA GCG TAC GTT TGA TTT CCA CCT TGG TCC CTT GGC-3' (SEC ID n° 12)) y el gen de cadena ligera se subclonó utilizando el vector pCR4Blunt-TOPO a modo de molde; se utilizó DNPL15Bglp y el cebador A27RN202 y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% y se purificó un fragmento de aproximadamente 400 pb mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El fragmento de ADNc de cadena ligera amplificado se digirió con BglII y BsiWI y el producto digerido se introdujo en el vector N5KG1-Val 1-40-1H había sido cortado con los mismos enzimas. Se determinó la secuencia de nucleótidos de ADN de la parte insertada y se confirmó que la secuencia que había sido amplificada por PCR e insertada era idéntica a la secuencia génica utilizada como molde. El vector obtenido se denominó N5KG1-Val 1-40-1IgG1. Si el anticuerpo 1-40-1 recombinante obtenido mediante la introducción de N5KG1-Val 1-40-1IgG1 en células FreeStyle293 indicadas posteriormente era idéntico o no al anticuerpo derivado de un hibridoma de 1-40-1 se confirmó mediante la determinación de la actividad de unión a la línea celular expresante de CD98_h/LAT1_h.

3-69-6

Para la amplificación de la cadena ligera se utilizó UMP y el cebador hk-2 y se repitió 5 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos y 72°C durante 3 minutos, seguido de un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 70°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos; además se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 68°C durante 15 segundos y 72°C durante 3 minutos. Además, se utilizó 1 ml de una solución diluida 5 veces de dicha solución de reacción a modo de molde; se utilizó NMP y el cebador hk5 y se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El producto de PCR purificado se ligó al vector pCR4Blunt-TOPO para la subclonación. A continuación se utilizaron los cebadores M13Forward(-20) (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' (SEC ID n° 13)), un cebador inverso de M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' (SEC ID n° 14)) y hk5 (5'-AGG CACACA ACA GAG GCAG TTCCAGA TTT C-3' (SEC ID n° 2)) para determinar la secuencia de nucleótidos. Basándose en la información de secuencia se sintetizaron A27_F (5'-AGA GAG AGA GAT CTC TCA CCA TGG AAA CCC CAG

CGCAGC TTC TCT TC-3' (SEC ID nº 15)) y 39_20_L3Bsi (5'-AGA GAG AGA GCG TAC GTT TGA TCT CCA GCT TGG TCC CCT G-3' (SEC ID nº 16)). El gen de cadena ligera subclonado utilizando el vector pCR4Blunt-TOPO se utilizó a modo de molde, se utilizaron A27_F y 39_20_L3Bsi y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificó un fragmento de aproximadamente 400 pb mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El fragmento de ADNc de cadena ligera amplificado se digirió con BglIII y BsiWI y el producto digerido se introdujo en el vector N5KG1-Val Lark que había sido cortado con los mismos enzimas. El vector obtenido se denominó N5KG1-Val 3-69-6L.

Para la amplificación de la cadena pesada, se utilizó UMP y el cebador IgG1p (5'-TCT TGT CCA CCT TGG TGT TGC TGG GCT TGT G-3' (SEC ID nº 6)), se repitió 5 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos y 72°C durante 3 minutos, seguido de un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 70°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos; además se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 68°C durante 15 segundos y 72°C durante 3 minutos. Además, 2 µl de una solución diluida 5 veces de dicha solución de reacción se utilizó como molde, y se utilizó NUMP y IgG2p (IgG1.3.4) (5'-TGC ACG CCG CTG GTCAGG GCG CCT GAG TTC C-3' (SEC ID nº 7)) y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El producto de PCR purificado se ligó al vector pCR4Blunt-TOPO para la subclonación. A continuación se utilizó M13F, M13R e IgG2p como cebadores para determinar la secuencia de nucleótidos. Basándose en la información de secuencia se sintetizó Z3HP5Sal (5'-AGA GAG AGA GGT CGA CCCACCATG GAC TGG AGCATC CTT TT-3' (SEC ID nº 17)) y F24HNhe (5'-AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CGG TGA CCA GGG TTC-3' (SEC ID nº 10)). El gen de cadena pesada subclonado utilizando el vector pCR4Blunt-TOPO se utilizó a modo de molde, se utilizaron Z3HP5SalF y F24HNhe y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificó un fragmento de aproximadamente 450 pb mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El fragmento de ADNc de cadena pesada amplificado se digirió con Sall y NheI y el producto digerido se introdujo en N5KG1-Val 3-69-6L que había sido cortado con los mismos enzimas. Se determinó la secuencia de nucleótidos de ADN de la parte insertada y se confirmó que la secuencia que había sido amplificada por PCR e insertada era idéntica a la secuencia génica utilizada como molde. El vector obtenido se denominó N5KG1-Val 3-69-6IgG1. Si el anticuerpo 3-69-6 recombinante obtenido mediante la introducción de N5KG1-Val 3-69-6IgG1 en células FreeStyle293 indicadas posteriormente era idéntico o no al anticuerpo derivado de un hibridoma de 3-69-6 se confirmó mediante la determinación de la actividad de unión a la línea celular expresante de CD98_h/LAT1_h.

35 C2IgG1

Debido a que la subclase de C2 productor de hibridoma era IgM, se aisló una región variable del anticuerpo C2 (IgG1 C2) mediante PCR utilizando un cebador que había sido diseñado para contener una región variable de IgG derivada de la misma línea germinal.

Para la amplificación de la cadena ligera se utilizó UMP y el cebador hk-2 y se repitió 5 veces un ciclo de 94°C durante 5 segundos y 72°C durante 3 minutos, seguido de la repetición 5 veces de un ciclo de 94°C durante 5 segundos, 70°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos; además se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 5 segundos, 68°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos. Además, se utilizó 1 ml de una solución diluida 5 veces de dicha solución de reacción a modo de molde; se utilizó NMP y el cebador hk5 y se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El producto de PCR purificado se ligó al vector pCR4Blunt-TOPO para la subclonación. A continuación se utilizó M13F, M13R y hk5 como cebadores para determinar la secuencia de nucleótidos. Basándose en la información de secuencia se sintetizó C2-1 Lc Bgl II F (5'-AGA GAG AGA GAT CTC TCA CCA TGG AAA CCC CAG CGCAGC TTC TCT TC 3' (SEC ID nº 18)) y C2-1 Lc BsiWI R (5'-AGA GAG AGA GCG TAC GTT TGA TAT CCA CTT TGG TCC CAG GG-3' (SEC ID nº 19)). El gen de cadena ligera subclonado utilizando el vector pCR4Blunt-TOPO se utilizó a modo de molde, se utilizaron C2-1 Lc Bgl II F y C2-1 Lc BsiWI R y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificó un fragmento de aproximadamente 400 pb mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El fragmento de ADNc de cadena ligera amplificado se digirió con BglIII y BsiWI y el producto digerido se introdujo en el vector N5KG1-Val Lark que había sido cortado con los mismos enzimas. El vector obtenido se denominó N5KG1-Val C2L.

Para la amplificación de la cadena pesada se utilizó UMP y el cebador M655R (5'-GGC GAA GAC CCG GAT GGC TAT GTC-3' (SEC ID nº 20)) y se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Además, 1 µl de una solución diluida 5 veces de dicha solución de reacción se utilizó como molde, y se utilizó NUMP y M393R (5'-AAA CCC GTG GCC TGG CAG ATG AGC-3' (SEC ID nº 21)) y se repitió 30

5 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El producto de PCR purificado se ligó al vector pCR4Blunt-TOPO para la subclonación. A continuación se utilizaron los cebadores M13Forward(-20) (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G -3' (SEC ID n° 13)), un cebador inverso de M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' (SEC ID n° 14)) y M393R para determinar la secuencia de nucleótidos. Basándose en la información de secuencia se sintetizó C2hcSallF (5'-AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGA AGCACC TGT GGT TCT TCC TCC TGC T-3' (SEC ID n° 22)) y F24HNhe C2hcNheI (5'-AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CGG TGA CCA GGG TTC CCT GG3' (SEC ID n° 58)). El gen de cadena pesada subclonado utilizando el vector pCR4Blunt-TOPO se utilizó a modo de molde, se utilizaron C2hcSallF y C2hcNheI y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificó un fragmento de aproximadamente 450 pb mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El fragmento de ADNc de cadena pesada amplificado se digirió con Sall y NheI y el producto digerido se introdujo en N5KG1-Val C2L que había sido cortado con los mismos enzimas. Se determinó la secuencia de nucleótidos de ADN de la parte insertada y se confirmó que la secuencia que había sido amplificada por PCR e insertada era idéntica a la secuencia génica utilizada como molde. El vector obtenido se denominó N5KG1-Val C2lgG1.

C2lgG1NS

20 La región de marco de la cadena pesada en el gen C2lgG1 clonado tal como se ha indicado anteriormente contenía una mutación que no se observó en la línea germinal original. De esta manera, una secuencia de región variable de C2 que presentaba una secuencia de la línea germinal original se aisló mediante el método descrito posteriormente.

25 Se utilizó el vector N5KG1-Val C2lgG1 obtenido anteriormente como molde y los cebadores C2hc NS F (5'-CGT CCA AGA ACC AGT TCT CCC TGA AGC TGA-3' (SEC ID n° 23)) y C2hc NS R (5'-TCA GCT TCA GGG AGA ACT GGT TCT TGG ACG-3' (SEC ID n° 24)) para sustituir G y T en las posiciones 290 y 299 de la cadena pesada del anticuerpo C2 por A y C, respectivamente, con el fin de preparar N5KG1-Val C2lgG1NS. Si los anticuerpos C2lgG1 y C2lgG1NS recombinantes obtenidos mediante la introducción de N5KG1-Val C2lgG1 y N5KG1Val C2lgG1NS en células FreeStyle293 indicadas posteriormente, respectivamente, presentaban la misma especificidad o no que el anticuerpo IgM derivado del hibridoma de C2 se confirmó mediante la determinación de la actividad de unión a la línea celular expresante de CD98_h/LAT1_h. Las actividades de unión de C2lgG1 y C2lgG1NS eran prácticamente iguales.

C2lgmG1

35 Debido a que la forma de los sitios de unión de la cadena pesada y la cadena ligera pueden diferir de las de la IgM original al utilizar el método utilizado en C2lgG1, anteriormente, se llevó a cabo la conversión de secuencia indicada posteriormente. En otras palabras, se utilizaron 26 aminoácidos contiguos en el lado de la región variable respecto a una secuencia común (la secuencia GCL) en la región constante CH1 de la cadena γ de IgG y la cadena μ de IgM como secuencia de cadena μ y todos los aminoácidos en el lado de la región constante de la secuencia GCL se convirtieron en cadena γ (C2lg μ G1). La conversión de secuencia anteriormente indicada se llevó a cabo mediante el método descrito posteriormente.

45 Para la amplificación de la cadena pesada del ADNc de C2, se utilizó UMP y el cebador M655R y se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Además, se utilizó 1 ml de una solución diluida 5 veces de dicha solución de reacción a modo de molde; se utilizó NMP y M393R y se repitió 30 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El producto de PCR purificado se ligó al vector pCR4Blunt-TOPO para la subclonación. A continuación se utilizaron los cebadores M13Forward(-20) (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' (SEC ID n° 13)), un cebador inverso de M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' (SEC ID n° 14)) y M393R para determinar la secuencia de nucleótidos. Basándose en la información de secuencia se sintetizó C2hcSallF (5'-AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGA AGCACC TGT GGT TCT TCC TCC TGC T-3' (SEC ID n° 22)) y Mu-GCL-Gamma L (5'-CAC CGG TTC GGG GAA GTA GTC CTT GAC GAG GCAGCA AAC GGC CAC GCT GCT CGT-3' (SEC ID n° 25)). El gen de cadena pesada subclonado utilizando el vector pCR4Blunt-TOPO se utilizó a modo de molde, se utilizaron C2hcSallF y Mu-GCL-Gamma L y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. Este producto de amplificación por PCR se denominó C2V μ . A continuación, se utilizó el vector N5KG1-Val Lark a modo de molde y se utilizó Mu-GCL-Gamma U (5'-ACG AGCAGC GTG GCC GTT GGC TGC CTC GTCAAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG-3' (SEC ID n° 26)) y IgG1_h BamHI L (5'-CGC GGA TCC TCA TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GCT-3' (SEC ID n° 27)) y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa

al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. Este producto de amplificación por PCR se denominó C_γ1. Cada 5 ml de soluciones diluidas 3 veces de C2V_μ y C_γ1 fueron sometidas a 3 repeticiones de un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos en ausencia de un cebador. Dicha solución de reacción se calentó a 99°C durante 5 minutos y después se diluyó 10 veces. Se utilizaron 5 ml de la solución diluida a modo de molde; se utilizaron C2hcSallF y IgG1_h BamHI L y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. El fragmento de ADNc amplificado por PCR se digirió con Sall y SmaI y el producto digerido se introdujo en el vector N5KG1-Val Lark que había sido cortado con los mismos enzimas y que contenía el gen de cadena ligera de C2 indicado anteriormente. Se determinó la secuencia de nucleótidos de ADN de la parte insertada y se confirmó que la secuencia que había sido amplificada por PCR e insertada era idéntica a la secuencia génica utilizada como molde. El vector obtenido se denominó N5KG1-Val C2I_μG1. Se determinó la actividad de unión del anticuerpo C2I_μG1 mediante la determinación de la actividad de unión del recombinante obtenido mediante la introducción génica de N5KG1-Val C2I_μG1 en las células FreeStyle293 indicadas posteriormente en la línea celular expresante de CD98_h/LAT_h.

Las secuencias de ADN que contenían la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de K3, 1-40-1 y 3-69-6 y las secuencias de aminoácidos que contenían la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera eran secuencias representadas por los números de secuencia siguientes, respectivamente.

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de K3> (SEC ID nº 28)

**AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTC
CTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTCTGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGCA**

**GTCTGGAGCAGAAGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCT
GTAAGGGTTCTGGATACAGGTTTACCGACTACTGGATCGGCTGGGTGC
GCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCTTCTATCCT
GGTGA CTCTGATGCCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCAC
CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAACACCGCCTACCTGCAGTGGAGCA
GCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTATTGTGCGAGACGGCGA
GATATAGTGGGAGTACTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCCTCA**

25

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de K3> (SEC ID nº 29)

**MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFT
DYWIGWVRQMPGKGLEWMGIFYPGDS DARYSPSFQGGQVTISADKSIN
TAYLQWSSLKASDTAMYCARRRDIVGGTDYWGQGLTVTVSS**

30

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de K3> (SEC ID nº 30)

**AGAGAGAGAGATCTCTACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
TCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACAC
AGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGACTGGTACCAA
CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAGC
AGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGA
CAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG
TTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGATCACCTTCGGCCAAGGGA
CACGACTGGAGATTA**

<Región variable de cadena ligera de K3> (SEC ID nº 31)

MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS
SYLDWYQQKPGQAPRL LIYDASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEP
EDFAVYYCQQRSNWITFGQTRLEIK

5 <Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 1-40-1> (SEC ID nº 32)

AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTC
CTTGTTGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAG

TCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGGCATGACCTGGGTCC
GCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTACTATTAGTTGG
AATGGTGGTGGCACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCAC
CATCTCCAGAGACAACGCCAAGA ACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAG
TCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTG TATTACTGTGCGGGATATTGTAT
TATTACCGGCTGCTATGCGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA
CCGTCTCCTCA

10 <Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 1-40-1> (SEC ID nº 33)

MEFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGVVVRP GGSRLRLSCAASGFTF
DDYGMTWVRQAPGKGLEWVSTISWNGGGTGYADSVKGRFTISR DNA
KNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAGYCIITG CYADYWGQGLVTVSS

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 1-40-1> (SEC ID nº 34)

AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
TCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACAC
AGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAA
CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAC
AGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGA
CAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG
TTTATTACTGTGAGCAGCGTAGCAACTGGTGGACGTT CGGCCAAGGGA
15 CCAAGGTGGAAATCAAA

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 1-40-1> (SEC ID nº 35)

MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS
SYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEP
EDFAVYYCQQRSNWWTFGQGTKVEIK

20 <Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 3-69-6> (SEC ID nº 36)

GTCGACCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTCTTGGTGGCA

GCAGCAACAGGTGCCCACTCCCAGGTTCAACTGGTGCAGTCTGGAGC
TGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGTAAGGCTT
CTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGATGCGACAGGCC
CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGT
AATACGAACTATGTACAGAAGTTCCAGGACAGAGTCACCATGACCAGA
GACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATC
TGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGGCAGCAATT
GGTATGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
CTCCTCA

<Región variable de cadena pesada de 3-69-6> (SEC ID nº 37)

RRPTMDWTWSILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS
GYTFTSYGISWMRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYVQKFQDRVMT
RDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRGSNWYGFDPWGQGLVTVSS

5

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 3-69-6> (SEC ID nº 38)

AGATCTCTCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTA
CTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA
GGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG
GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGA
AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGT
ATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCA
AGCTGGAGATCAAA

10

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 3-69-6> (SEC ID nº 39)

RSLTMETPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQ
SVSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI
SRLEPEDFAVYYCQYGGSSYTFGQGTKLEIK

15 Las secuencias de ADN que contenían la región variable de cadena pesada de C2 y la región variable de cadena ligera y las secuencias de aminoácidos que contenían la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se muestran a continuación.

20 <Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de C2IgG1> (SEC ID nº 40)

GTCGACCACCATGAAGCACCTGTGGTTCCTCCTGCTGGTGGCGG
CTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCA
GGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTC
TGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTACTACTGGGGCTGGATCCGCCA
GCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGTG
GGAGTACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCG
TAGACACGTCCAAGAGCCAGTTCTCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC
GCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAGGGACGGGGC
TCGCCCTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT
CA

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C2IgG1> (SEC ID nº 41)

5 STTMKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG
SISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTS
KSQFFLKLSSVTAADTAVYYCARQGTGLALFDYWQGTLVTVSS

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de C2IgG1NS> (SEC ID nº 42)

10 GTCGACCACCATGAAGCACCTGTGGTTCCTCCTGCTGGTGGCGG
CTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCA
GGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTC
TGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTACTACTGGGGCTGGATCCGCCA
GCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGTG
GGAGTACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCG
TAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC
GCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAGGGACGGGGC
TCGCCCTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT
CA

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C2IgG1NS> (SEC ID nº 43)

15 STTMKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG
SISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARQGTGLALFDYWQGTLVTVSS

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de C2IgG1 hasta el sitio de unión y hasta la IgG1 humana> SEC ID nº 44)

GTCGACCACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGG
 CTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCA
 GGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTC
 TGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCA
 GCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGTG
 GGAGTACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCG
 TAGACACGTCCAAGAGCCAGTTCTTCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC
 GCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAGGGACGGGGC
 TCGCCCTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT
 CAGGGAGTGCATCCGCCCAACCCTTTTCCCCCTCGTCTCCTGTGAGA
 ATTCCCCGTCCGATACGAGCAGCGTGGCCGT

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C2IgG1 hasta el sitio de unión y hasta la IgG1 humana> (SEC ID nº 45)

5

STTMKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGG
 SSSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTS
 KSQFFLKLSSVTAADTAVYYCARQGTGLALFDYWQGTLTVSSGSASA
 PTLFPLVSCENSPSDTSSVAV

<Nucleotide sequence of the light chain variable region of C2IgG1 and C2IgmG1> (SEQ ID NO: 46)

AGATCTCTCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCCTCCTGCTA
 CTCTGGCTCCAGATAACCACGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA
 GGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCCTGCAG
 GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGA
 AACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
 GCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
 ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTCCGAGTGT

10

ATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTATATTTCACTTTCCGGCCCTGG
 GACCAAAGTGGATATCAA

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C2IgG1 y C2IgmG1> (SEC ID nº 47)

RSLTMETPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQ
 SVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI
 SRLEPEDFAVYYCQYGSPIFTFGPGTKVDIK

15

Las regiones variables de cadena ligera y las regiones variables de cadena pesada de KE y C2IgG1 (es decir, los ácidos nucleicos de las secuencias representadas por SEC ID nº 28 y 30 y SEC ID nº 40 y 46) entre las secuencias de anticuerpo anteriormente indicadas se introdujeron en el vector pCR4Blunt-TOPO y los resultados se depositaron en el depósito de organismos de patente internacional, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, asignándoles los números de acceso FERM BP-10552 (indicación para la identificación: K3/pCR4) y FERM BP-10551 (indicación para la identificación: C2IgG1/pCR4).

20

Las regiones variables de anticuerpo respectivas contienen la cadena pesada y la cadena ligera y también la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción utilizada para la unión y el aislamiento. Las regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos respectivos pueden aislarse utilizando los enzimas de restricción BglIII y BsiWI, y

25

las regiones variables de cadena pesada pueden aislarse utilizando los enzimas de restricción Sall y NheI. Las secuencias génicas de los que contienen las regiones variables de anticuerpo respectivas insertadas en el vector pCR4Blunt-TOPO, el sitio de restricción del enzima de restricción y similares, se muestran a continuación.

5 <K3/pCR4> (SEC ID nº 48)

AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
 TCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACAC
 AGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
 CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGACTGGTACCAA

CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAGC
 AGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGA
 CAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG
 TTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGATCACCTTCGGCCAAGGGA
 CACGACTGGAGATTAACGTACGCTCTCTCTCTAGAGAGAGAGGTCG
 ACCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTC
 CAAGGAGTCTGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAAG
 TGAAAAAGCCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGA
 TACAGGTTTACCGACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGG
 GAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCTTCTATCCTGGTGACTCTGATG
 CCAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGAC
 AAGTCCATCAACACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTC
 GGACACCGCCATGTATTATTGTGCGAGACGGCGAGATATAGTGGGAG
 GTACTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT
 AGCCTCTCTCTCT

10 <C2IgG1/pCR4> (SEC ID nº 49)

AGAGAGAGAGATCTCTACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCC
 TCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGC
 AGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTC
 TCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTTCTTAGCCTGGTA
 CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCAT
 CCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT
 GGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTC
 GCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTATATTCACTTTCG
 GCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACGCTCTCTCTCTAGAGAG
 AGAGGTCGACCACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTG
 GCGGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGG
 GCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT
 GTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATC
 CGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTA
 TAGTGGGAGTACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCAT
 ATCCGTAGACACGTCCAAGAGCCAGTTCTTCCTGAAGCTGAGCTCTGT
 GACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAGGGACG
 GGGCTCGCCCTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
 CTCCTCAGCTAGCCTCTCTCTCT

Ejemplo 7: preparación de anticuerpo recombinante

- 5 El vector de expresión del anticuerpo recombinante construido en el Ejemplo 6 se introdujo en las células huésped para preparar células expresantes de anticuerpo recombinante. Como células huésped para la expresión se utilizó una línea celular deficiente en dhfr de células CHO (ATCC n° CRL-9096). El vector se introdujo en las células huésped mediante electroporación. Se linearizaron aproximadamente 2 µg del vector de expresión de anticuerpos con enzimas de restricción; se introdujo el gen en 4x10⁶ células CHO bajo las condiciones de 350V y 500 mF
 10 utilizando un aparato de electroforesis Bio-Rad y las células se inocularon en una placa de cultivo de 96 pocillos. Se añadió el agente correspondiente a un marcador de selección del vector de expresión y se cultivaron en continuo las células. Tras comprobar la apariencia de las colonias, se cribó la línea celular expresante de anticuerpos mediante el método descrito en el Ejemplo 4. El anticuerpo se purificó a partir de las células cribadas según el método en el Ejemplo 8. Además, se introdujo el vector de expresión de anticuerpos recombinantes en las células FreeStyle293 (fabricado por Invitrogen) según el manual de instrucciones adjunto con el fin de expresar un anticuerpo recombinante.
 15

Ejemplo 8: purificación de anticuerpo

- 20 Se preparó un sobrenadante de cultivo de hibridoma que contenía anticuerpo IgG humano mediante el método descrito posteriormente. El hibridoma productor de anticuerpos se aclimató en medio eRDF (fabricado por Kyokuto Pharmaceutical Industry Co., Ltd.) que contenía insulina bovina (5 µg/ml, fabricada por Gibco), transferrina humana (5 mg/ml, fabricada por Gibco), etanolamina (0,01 mM, fabricada por Sigma) y selenita sódica (2,5x10⁻⁵ mM, fabricada por Sigma). El hibridoma se cultivó en un matraz de cultivo de tejidos y el sobrenadante de cultivo se recogió tras alcanzar la tasa viable del hibridoma el 90%. El sobrenadante recogido se filtró a través de filtros de 10 µm y 0,2 µm (fabricados por Gelman Science) para eliminar contaminantes tales como el hibridoma y similares. El sobrenadante de cultivo que contenía el anticuerpo se purificó por afinidad utilizando proteína A (fabricado por Amersham), PBS como tampón de adsorción y tampón de citrato sódico 20 mM (pH 3,0) como tampón de elución.
 25 Las fracciones de elución se ajustaron a pH aproximadamente 6,0 mediante la adición de tampón de fosfato sódico 50 mM (pH 7,0). La solución de anticuerpos preparada se sustituyó por PBS utilizando una membrana de diálisis (corte de 10.000, fabricada por Spectrum Laboratories) y se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de membrana MILLEXGV (fabricado por Millipore) con un tamaño de poro de 0,22 µm, rindiendo el anticuerpo
 30

purificado. La concentración del anticuerpo purificado se obtuvo midiendo la absorbancia a 280 nm y convirtiendo el valor medido como 1,45 x densidad óptica en mg/l.

Ejemplo 9: especificidades de cada uno de los anticuerpos monoclonales

5 Las reactividades de los anticuerpos monoclonales respectivos obtenidos en el Ejemplo 4 se examinaron mediante el mismo método que el análisis de FACS claramente descrito en el Ejemplo 5. Las líneas celulares preparadas en el Ejemplo 2 se utilizaron para preparar una suspensión celular a una densidad de 2×10^6 /ml utilizando un tampón de tinción (TT) y la suspensión celular se dispuso en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (fabricada por Becton Dickinson) a razón de 50 μ l/pocillo. La concentración de cada uno de los anticuerpos recombinantes preparados en los Ejemplos 4 a 8 se ajustó a 5 μ g/ml utilizando TT y se añadieron 50 ml de la solución de anticuerpos a los pocillos respectivos y se agitó. Se utilizó un anticuerpo IgG1 humano anti-dinitrofenilo (DNP) preparado en ratones KM a modo de control negativo. Tras la reacción a temperatura del hielo durante 30 minutos, la mezcla se centrifugó (2.000 rpm, 4°C, 2 minutos) para eliminar el sobrenadante. Se lavaron una vez los pellets con 100 μ l/pocillo de TT, seguido de anticuerpo Igk F(ab')₂ de conejo antihumano marcado fluorescentemente con RPE diluido 200 veces (fabricado por Dako Cytomation) a 50 μ l/pocillo y la solución resultante se hizo reaccionar a temperatura del hielo durante 30 minutos. Tras lavar con TT una vez, los pellets resultantes se suspendieron en 300 μ l de TT y se midió mediante FACS la intensidad de la fluorescencia que mostraba la unión de anticuerpo.

20 Como resultado, todos los anticuerpos mostraban una fuerte actividad de unión a las células CT26 expresantes de CD98_h/LAT1_h-E (fig. 1) o a las células L929 expresantes de CD98_h/LAT1_h-E (fig. 2), mientras que no se observó actividad de unión a células CT26 ó a células L929. Además, ninguno de los anticuerpos se unió a las células L929 expresantes de LAT1_h-E pero se unieron a las células L929 expresantes de CD98_h. Se encontró de acuerdo con lo anterior que el sitio de unión de los anticuerpos C2, K3, 7-95-8, 10-60-7, 3-69-6 y 1-40-1 se localizó en CD98_h (fig. 2).

Ejemplo 10: Regiones de la proteína CD98_h participantes en la unión a antígeno de cada uno de los anticuerpos monoclonales

30 Se examinó la región de la molécula de CD98_h que resulta importante para la unión de cada uno de los anticuerpos monoclonales.

35 En primer lugar se examinó la reactividad con una línea celular K562 tratada con tunicamicina. Se inocularon 2×10^5 células K562 en una placa de 6 pocillos (4 ml/pocillo) y se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 72 horas en presencia/ausencia de 5 μ g/ml de tunicamicina (fabricada por Sigma). Se confirmó mediante transferencia western que el peso molecular de CD98_h, cuyo peso molecular original era de aproximadamente 80 kDa, era de aproximadamente 60 kDa bajo dicha condición, lo que corresponde a un valor teórico tras la eliminación de la cadena carbohidrato unida a N. Las células se recogieron tras el cultivo y la suspensión a una densidad de 2×10^6 /ml en un tampón de tinción (TT). La suspensión celular se dispuso en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (fabricada por Becton Dickinson) a razón de 50 μ l/pocillo. Cada uno de los anticuerpos recombinantes preparados a una densidad de 5 μ g/ml utilizando TT se añadió a razón de 50 μ l/pocillo y la solución resultante se hizo reaccionar a temperatura de hielo durante 30 minutos. Se utilizó un anticuerpo IgG1 humano anti-DNP a modo de control negativo. Tras lavar una vez con TT, se añadió un anticuerpo Igy F(ab')₂ de cabra antihumano marcado fluorescentemente con RPE (fabricado por Southern Biotech) diluido 200 veces con TT y la mezcla se incubó a temperatura de hielo durante 30 minutos. Tras lavar con TT una vez, las células se suspendieron en 300 μ l de tampón de FACS y se midió mediante FACS la intensidad de la fluorescencia que mostraba la unión de anticuerpo.

50 Como resultado, no se observó reducción de la actividad de unión a las células K562 no tratadas con tunicamicina en comparación con la actividad de unión a las células no tratadas para ninguno de los anticuerpos (fig. 3). Los resultados anteriores demuestran que el sitio de unión de los anticuerpos respectivos no era la cadena carbohidrato unida a N, sugiriendo fuertemente que estos anticuerpos monoclonales eran un anticuerpo de CD98_h. Además, la región de CD98_h que resulta importante para la unión de los anticuerpos monoclonales respectivos se examinó en el Ejemplo 11.

Ejemplo 11: región de la proteína CD98 humana importante para la reacción de unión de cada uno de los anticuerpos

60 Debido a que ninguno de los anticuerpos mostraba reactividad cruzada con CD98 de ratón (CD98_m), se utilizó una quimera de CD98 preparada artificialmente mediante la unión de CD98_m y CD98_h para examinar una región de la proteína CD98 humana importante para la reacción de unión de cada uno de los anticuerpos.

La quimera de CD98 se preparó tal como se describe posteriormente. Basándose en la información de secuencia sobre CD98_m y CD98_h, se sintetizó CD98_h-U EcoRI (5'-CCG GAA TTC cCa cCa TGA GCC AGG ACA CCG

AGG TGG ATA TGA-3' (SEC ID nº 50)), NotI hCD98 (5'-AAG GAA AAA AGC GGC CGC TCA TCA GGC CGC GTA GGG GAA GCG GAG CAG CAG-3' (SEC ID nº 51)), CD98_m EcoRI (5'-CCG GAA TTC CCA CCA TGA GCC AGG ACA CCG AAG TGG ACA TGA AA 3' (SEC ID nº 52)), NotI CD98_m-L (5'-AAG GAA AAA AGC GGC CGC TCA TCA GGC CAC AAA GGG GAA CTG TAA CAG CA-3' (SEC ID nº 53)), CD98_c D2-F (5'-TCA TTC TGG ACC TTA CTC CCA ACT ACC-3' (SEC ID nº 54)), CD98_c D2-R (5'-GGT AGT TGG GAG TAA GGT CCA GAA TGA-3' (SEC ID nº 55)), CD98_c D3-F (5'-TGC TCT TCA CCC TGC CAG GGA CCC CTG TTT T-3' (SEC ID nº 56)), yCD98_c D3-R (5'-AAA ACA GGG GTC CCT GGC AGG GTG AAG AGC A-3' (SEC ID nº 57)). En la PCR, se utilizó como molde CD98_m (GenBank/EMBL/DDBJ nº de acceso U25708), un vector plásmido pcDNA3.1-CD98_m que conservaba el ADNc codificante de CD98 humano, y pEF6/CD98_h preparado en el Ejemplo 1.

Se utilizó KOD-Plus de Toyobo para la amplificación del ADNc. Se preparó una solución de reacción que presentaba una composición de 15 µl de ADNc, 5 µl de tampón 10xKOD-Plus, 5 µl de mezcla de dNTP, 1 µl de KOD-Plus, 3 µl de MgSO₄ 25 mM, un cebador directo y un cebador inverso en un volumen final de 50 µl utilizando agua doblemente destilada y se sometió a PCR.

Se utilizó ADNc, cebador directo 1 y cebador inverso 1 ó ADNc 2, cebador directo 2 y cebador inverso 2 y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos (un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 50 segundos). Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. Los productos de amplificación por PCR se denominaron P1 y P2, respectivamente. Se sometieron 3 veces alícuotas de 5 µl de soluciones diluidas 2 a 3 veces de P1 y P2 a un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos en ausencia de un cebador. Tras calentar dicha solución de reacción a 99°C durante 5 minutos dicha solución se diluyó 5 a 10 veces. Se utilizaron 5 µl de dicha solución a modo de molde conjuntamente con cebador directo 1 y cebador inverso 2 y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C (55°C) durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick.

Se prepararon quimera CD98-1, quimera CD98-2 y quimera CD98-3 utilizando las combinaciones siguientes (ADNc 1: cebador directo 1: cebador inverso 1, y ADNc y cebador directo 2: cebador inverso 2): (pEF6/CD98_h: EcoRI CD98_h-U: CD98_c-D2-R; y pcDNA3.1-CD98_m: CD98_c-D2-F: NotI-CD98_m-L); (pEF6/CD98_h: EcoRI CD98_h-U: CD98_c-D3-R; y pcDNA3.1-CD98_m: CD98_c-D3-F: NotI-CD98_m-L); y (pcDNA3.1-CD98_m: EcoRI-CD98_m-U: CD98_c-D2-R; y pEF6/CD98_h: CD98_c-D2-F: NotI-CD98_h-L). Los fragmentos de ADNc amplificados por PCR respectivos se digirieron con EcoRI y NotI y se ligaron con un vector pEF6myc-His/Bsd (fabricado por Invitrogen) que había sido cortado con los mismos enzimas. Se determinó la secuencia de nucleótidos de ADN de la parte insertada y se confirmó que la secuencia que había sido amplificada por PCR e insertada era idéntica a la secuencia génica utilizada como molde. Los vectores respectivos se expresaron en células L929 conjuntamente con el vector pEF1/LAT1_h-EGFP preparado en el Ejemplo 1 mediante el mismo método que en el Ejemplo 2, y la unión de los anticuerpos marcados con FITC respectivos se examinó mediante el análisis de FACS mediante el mismo método que en el Ejemplo 10. Como resultado (fig. 4), los anticuerpos K3, 7-95-8, 10-60-7 y 3-69-6 se unieron únicamente a células L929 que expresaban la quimera CD98-3, de manera similar al anticuerpo anti-CD98 humano marcado con FITC disponible comercialmente (clon UM7F8, fabricado por Becton Dickinson, nº de cat. 556076), sugiriendo que la región entre el residuo aminoácido 372 y el residuo aminoácido 530 de CD98_h resulta importante para la unión de dichos anticuerpos. Por otra parte, el anticuerpo C2 y el anticuerpo neutralizado 1-40-1 se unieron fuertemente únicamente a la quimera CD98-2, demostrando que la región entre el residuo aminoácido 104 y el residuo aminoácido 371 de CD98_h resulta importante para la unión de dichos anticuerpos.

Ejemplo 12: actividad de supresión de la incorporación de aminoácidos de cada uno de los anticuerpos monoclonales

Con el fin de determinar si los anticuerpos monoclonales influían o no sobre la incorporación de aminoácidos por parte de las células T24 de la línea celular de cáncer de vejiga humano, se llevó a cabo un experimento de incorporación de sustratos utilizando leucina como sustrato siguiendo el método de Kanai *et al.* (Kim *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1565: 112-122, 2002) tal como se describe posteriormente. Se inocularon 1x10⁵ células de la línea celular T24 en una placa de cultivo de 24 pocillos y se cultivaron en un medio MEM (fabricado por Sigma Aldrich) que contenía FCS al 10% a 37°C en 5% de CO₂ durante 2 días. Tras el cultivo, se separó el medio, se añadieron 0,25 µl/pocillo de HBSS(-) (sin Na⁺) que contenía 200 µg/ml del anticuerpo y las células se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 10 minutos. Se utilizaron los anticuerpos recombinantes para los anticuerpos C2, K3, 7-95-8, 10-60-7, 3-69-6, 1-40-1 y anti-DNP humano y se utilizó el anticuerpo derivado de un hibridoma para el anticuerpo 5-80-1. A continuación se eliminó el sobrenadante, se añadieron 0,5 µl/pocillo de HBSS(-) (sin Na⁺) que contenía ¹⁴C-Leu 1 mM (fabricado por Moravek Biochemicals) y las células se cultivaron durante 1 minuto. Tras lavar 3 veces con solución HBSS(-) (sin Na⁺) enfriada con hielo, se añadió hidróxido sódico 0,1 N a razón de 0,5 µl/pocillo y se recogieron las células. Se midió la cantidad de ¹⁴C-Leu en la solución recogida, con un contador de centelleo líquido modelo LSC-

5100 (fabricado por ALOKA). La incorporación de ^{14}C -Leu de las células respectivas se obtuvo midiendo la concentración de proteínas de la solución recogida mediante el método BCA y estandarizando el valor obtenido respecto a la cantidad de proteína. Los resultados (fig. 5) demuestran que 1-40-1, K3, C2IgG1, 10-60-7 y 3-69-6 suprimen significativamente la incorporación de leucina en comparación con el anticuerpo de control (anticuerpo humano de DNP). Se llevaron a cabo los experimentos siguientes utilizando 1-40-1, K3, C2IgG1, 10-60-7 y 3-69-6, los cuales suprimían significativamente la incorporación de leucina.

Ejemplo 13: marcado de fluorescencia de cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-CD98 h/LAT1 h

Cada uno de los anticuerpos se marcó fluorescentemente mediante el método descrito posteriormente. Se unió una sustancia fluorescente, el isotiocianato de fluoresceína (FITC, fabricado por Sigma) a los anticuerpos recombinantes respectivos preparados en los Ejemplos 4 a 8 siguiendo el manual de instrucciones adjunto. A 1-2 mg/ml del anticuerpo en tampón de carbonato sódico 200 mM (pH 8,3 a 8,5), se añadió FITC disuelto en dimetilformamida en una cantidad 20 a 40 veces la de la molécula de anticuerpo y la mezcla se hizo reaccionar bajo agitación a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas. La mezcla se aplicó a una columna de filtración en gel (NAP5, fabricada por Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con PBS para eliminar FITC que no se unió al anticuerpo. Bajo esta condición, se unieron aproximadamente tres FITC a cada molécula del anticuerpo. Todos los anticuerpos marcados fluorescentemente unidos a una línea celular DLD-1 de cáncer colorrectal humano que se había confirmado que expresaba CD98_h.

Ejemplo 14: reactividad de cada uno de los anticuerpos monoclonales con células T derivadas de sangre periférica humana, células B y monocitos y células endoteliales aórticas humanas normales (CEAH).

Es conocido que CD98 se expresa en monocitos, células T activadas y células endoteliales normales en cultivo. De esta manera, se determinaron las reactividades de los anticuerpos respectivos con células T derivadas de sangre periférica humana, células B y monocitos y células endoteliales aórticas humanas normales (CEAH). Se prepararon células derivadas de sangre periférica humana mediante el método siguiente. Se diluyeron 2 veces 10 ml de sangre periférica humana que contenía 1 ml de heparina (fabricada por Novo) con PBS, se aplicó una capa sobre 20 ml de una solución de Ficoll-Paque PLUS (fabricada por Amersham Pharmacia Biotech) y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 30 minutos y después se recogieron las células. Tras lavar con PBS 2 veces, se prepararon células mononucleares. Parte de las células mononucleares se cultivó en un medio RPMI (fabricado por Gibco) que contenía 10 mg/ml de fitohemaglutinina (fabricada por Sigma, PHA), FCS al 10%, solución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM (fabricada por Gibco), 2-mercaptoetanol $5,5 \times 10^{-6}$ M (fabricado por Gibco) y penicilina/estreptomicina/glutamina (fabricada por Gibco) a 37°C en 5% de CO₂ durante 72 horas. Se observó la expresión de CD25, que es un marcador de activación, para las células T derivadas de sangre periférica humana y células B mediante estimulación con PHA (análisis de FACS utilizando anticuerpo anti-CD25 humano marcado con FITC (fabricado por Becton Dickinson, n° de cat. 555431)). Las células preparadas respectivas se suspendieron en el tampón de tinción (TT) a una densidad de 2×10^6 /ml y la suspensión celular se dispuso en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (fabricada por Becton Dickinson) a razón de 50 μ l/pocillo. Los anticuerpos marcados con FITC respectivos preparados en el Ejemplo 13 a una concentración de 5 μ g/ml se hicieron reaccionar con un anticuerpo anti-CD3 humano (fabricado por Becton Dickinson, n° de cat. 555340), un anticuerpo anti-CD14 humano (fabricado por Becton Dickinson, n° de cat. 347497) o un anticuerpo anti-CD19 humano (fabricado por Immunotech, n° de cat. IM1285) a temperatura de hielo durante 30 minutos. Se utilizó el anticuerpo anti-CD98 humano marcado con FITC disponible comercialmente (clon UM7F8) a modo de control positivo y se utilizó el anticuerpo IgG1 anti-DNP humano marcado con FITC a modo de control negativo. Tras lavar con TT una vez, lo resultante se suspendió en 300 μ l de tampón FACS y se determinaron mediante FACS las reactividades de los anticuerpos respectivos.

Como resultado, los anticuerpos aparte de C2IgG1 mostraron un modo de unión similar al de UM7F8, uniéndose de esta manera en grado significativo a los monocitos, células T activadas y células B activadas (fig. 6 y fig. 7). Por otra parte, no se observó que C2IgG1 se uniese significativamente a ninguna de las células (fig. 6 y fig. 7).

Las células CEAH (fabricadas por Cambrex) se cultivaron según el manual de instrucciones adjunto y después las células se subcultivaron no más de 4 veces. Las reactividades de los anticuerpos C2IgG1, K3, 7-95-8, 10-60-7, 3-69-6 y 1-40-1 con las CEAH en cultivo se examinaron mediante el método descrito anteriormente. Al hacer reaccionar los anticuerpos respectivos a las concentraciones de 3,2 ng/ml a 50 μ g/ml, K3, 7-95-8, 10-60-7, 3-69-6 y 1-40-1 se unieron a CEAH pero C2IgG1 no se unió a CEAH (fig. 8).

Por otra parte, se demostró que todos los anticuerpos presentaban una especificidad más alta para las células de cáncer DLD-1 que UM7F8 bajo determinadas condiciones (una concentración de anticuerpo de 3 μ g/ml o inferior en el presente Ejemplo) al hacer reaccionar los anticuerpos con la línea celular de cáncer colorrectal humano DLD-1 bajo las mismas condiciones (fig. 8). Se sugería fuertemente que C2IgG1 en particular era un anticuerpo con elevada especificidad para el cáncer. Se llevó a cabo el experimento descrito a continuación utilizando C2IgG1, K3 y 3-69-6.

Ejemplo 15: reactividad de cada uno de los anticuerpos monoclonales con las líneas celulares de cáncer.

5 Las reactividades de los anticuerpos respectivos C2IgG1, K3 y 3-69-6 con la línea celular de cáncer colorrectal (DLD1), una línea celular de cáncer pulmonar (H226), una línea celular de cáncer de próstata (DU145), las líneas celulares de melanoma (G361, SKMEL28 y CRL1579), una línea celular de linfoma no de Hodgkin (Ramos), una línea celular de cáncer de vejiga (T24), las líneas celulares de cáncer de mama (MCF y MDA-MB-231), una línea celular de cáncer pancreático (HS766T), una línea celular de mieloma múltiple (IM9) y líneas celulares de leucemia eritroblástica (ver la fig. 3 para K562) se examinaron mediante el análisis de FACS mediante el mismo método que en el Ejemplo 9. La suspensión celular a una densidad de 2×10^6 /ml se preparó con un tampón de tinción (TT) para las líneas celulares y se dispensó en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (fabricado por Becton Dickinson) a razón de 50 μ l/pocillo. El anticuerpo o el anticuerpo marcado con FITC preparado a una concentración de 5 μ g/ml se añadió a razón de 50 μ l/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura de hielo durante 30 minutos. El anticuerpo IgG1 anti-DNP humano o el anticuerpo IgG1 anti-DNP humano marcado con FITC se utilizó a modo de control negativo. 10 Tras lavar una vez con TT, se añadieron 50 μ l del anticuerpo Igy F(ab')₂ de cabra antihumano marcado fluorescentemente con RPE (fabricado por Southern Biotech) diluido 200 veces con TT y la mezcla se incubó a temperatura de hielo durante 30 minutos. En el caso del anticuerpo marcado con FITC, se omitió esta operación. 15 Tras lavar con TT una vez, lo resultante se suspendió en 300 μ l de tampón FACS y se determinó la intensidad de fluorescencia media de las células respectivas mediante FACS. 20

Como resultado, se encontró que todos los anticuerpos presentaban actividad de unión a las líneas celulares de cáncer respectivas (fig. 9 y fig. 10). Además, todos los anticuerpos se unieron fuertemente a las líneas celulares de cáncer colorrectal humano Colo205, SW480, SW620, LOVO, LS180 y HT29.

Ejemplo 16: efecto antitumoral de K3, C2IgG1 y 3-69-6 en un modelo de ratón de cáncer

Se examinó el efecto antitumoral de los anticuerpos monoclonales recombinantes K3, C2IgG1 y 3-69-6 preparados en los Ejemplos 4 a 8 utilizando un modelo de ratón de cáncer siguiendo el método descrito posteriormente.

30 Se asignaron ratones Balb/c desnudos de 5 semanas de edad (obtenidos de Clea Japan) en grupos que consistían de 5 ratones basándose en el peso corporal individual. Se trasplantó por vía subcutánea en el abdomen una mezcla de 5×10^6 células Colo205 de cáncer colorrectal y 5 mg del anticuerpo en 100 ml de PBS. Los días 2, 4 y 6 después del trasplante, el anticuerpo disuelto en un solvente (PBS que contenía 1% de suero de ratón) a una concentración de 100 μ g/100 μ l se administró por vía intraperitoneal en los ratones y se midió el tamaño del tumor. Se utilizó el solvente a modo de control negativo de anticuerpo. 35

En la fig. 11 se muestran los resultados del experimento anterior. Las líneas discontinuas respectivas en la fig. muestran los datos para los ratones individuales. En el grupo de control, se observó la injertación de células de la línea celular de cáncer en todos los individuos el día 5 y el volumen tumoral medio (calculado como diámetro largo x diámetro corto x diámetro corto x 0,5) \pm SE era de $165,55 \pm 31,71$ mm³ el día 12. En el grupo C2IgG1, por otra parte, sólo un individuo mostró crecimiento tumoral como en el grupo de control (una masa tumoral de 169,44 mm³ el día 12) aunque se observó una actividad antitumoral más fuerte con la administración del anticuerpo C2IgG1 en otros individuos. El volumen medio \pm SE de las masas tumorales el día 28 era de $1.977,64 \pm 442,04$ para el grupo de control y $775,31 \pm 622,47$ para el grupo de administración del anticuerpo C2IgG1, de esta manera, el anticuerpo C2IgG1 suprimió significativamente el crecimiento del tumor derivado de las células de cáncer Colo205 ($p < 0,01$). No se observó injertación de cáncer en ningún individuo del grupo de K3 ó del grupo de 3-69-6, ni siquiera tras 30 días o más. El peso corporal medio se redujo únicamente en el grupo de control (una reducción de aproximadamente 20% en comparación con el grupo de K3 el día 30 después del trasplante). 40 45

50 Basándose en estos resultados, se encontró que K3, C2IgG1 y 3-69-6 eran anticuerpos con actividad supresora del crecimiento de las células de cáncer.

Ejemplo 17: efecto antitumoral del anticuerpo monoclonal C2IgG1 en el modelo de ratón isogénico portador de cáncer

55 Se examinó el efecto antitumoral del anticuerpo monoclonal recombinante C2IgG1 preparado en los Ejemplos 4 a 8 en un modelo de ratón isogénico portador de cáncer siguiendo el método descrito posteriormente.

60 Los ratones Balb/c hembra en los que se habían trasplantado 5×10^6 células CT26 expresantes de CD98_h/LAT1_h-E preparadas en el Ejemplo 2, se dividieron en 2 grupos de 5 ratones basándose en el volumen tumoral. Se administraron por vía intraperitoneal 100 μ g/100 μ l de C2IgG1 en un solvente (PBS que contenía 1% de suero de ratón) en los ratones en el punto (el día 0) en que se había incrementado el volumen tumoral hasta aproximadamente 90 mm³ (calculado como diámetro largo x diámetro corto x diámetro corto x 0,5) los días 3 y 5. A

modo de control se administró solvente. Como resultado se observó que C2IgG1 presentaba una actividad de supresión significativamente fuerte del crecimiento de un tumor injertado (fig. 12).

Ejemplo 18: reactividades cruzadas de los anticuerpos C2IgG1 y K3 con células de mono

5 Se examinaron mediante análisis de FACS las reactividades cruzadas de C2IgG1 y K3 con células de mono (células COS-7). Se suspendieron 2×10^6 /ml en un tampón de tinción (TT). La suspensión celular se dispuso en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (fabricada por Becton Dickinson) a razón de 50 μ l/pocillo. A continuación se añadieron 10 50 μ l del anticuerpo preparado en 5 μ g/ml con TT y lo resultante se dejó que reaccionase a temperatura de hielo durante 30 minutos. Se utilizó el anticuerpo IgG1 humano anti-DNP a modo de control negativo. Tras lavar una vez con TT, se añadieron 50 μ l/pocillo del anticuerpo Igy F(ab')₂ de cabra antihumano marcado fluorescentemente con RPE (fabricado por Southern Biotech) diluido 200 veces con TT y se dejó que reaccionase a temperatura de hielo 15 durante 30 minutos. Tras lavar con TT una vez, lo resultante se suspendió en 300 μ l de tampón FACS y se determinó la intensidad de fluorescencia media de las células respectivas mediante FACS. Como resultado, se encontró que tanto los anticuerpos que se unían a la línea celular COS-7, como los anticuerpos C2IgG1 y K3 presentaban reactividad cruzada con las células de mono (fig. 13).

Ejemplo 19: efecto de C2IgG1 en un modelo de ratón portador de cáncer

20 Se examinó la actividad antitumoral de C2IgG1 utilizando un modelo de ratón portador de cáncer siguiendo el método descrito posteriormente.

Se trasplantó subcutáneamente la línea celular Ramos de linfoma de Burkitt (obtenida de la ATCC) a razón de 3×10^6 /ratón en el lomo de ratones Balb/c-SCID de 6 semanas de edad (obtenidos de Clea Japan). El día 13 después del trasplante se midió el tamaño del tumor injertado y los ratones portadores de cáncer que presentaban un tumor de 30 a 140 mm³ se separaron en grupos que consistían de 6 ratones. Se administró C2IgG1 por vía intraperitoneal a razón de 100 mg/ratón (disueltos en 200 ml de PBS) 3 veces/semana. Se utilizó rituximab (fabricado por Zenyaku Kogyo) a modo de control positivo y se utilizó PBS a modo de control negativo. Se midió el volumen tumoral y el peso corporal 3 veces a la semana. Se midió un diámetro largo, un diámetro corto y la altura de las masas tumorales y se definió el volumen tumoral como el valor obtenido según la fórmula (diámetro largo) x (diámetro corto) x (altura)/2. 30

Se muestran los resultados en la fig. 14. Se observó un efecto significativo de supresión del crecimiento tumoral de la administración de C2IgG1 desde el día 16 tras el trasplante tumoral.

Ejemplo 20: C2IgG1NS con modificación de aminoácidos

Tanto C2IgG1 como C2IgG1NS presentaban un contenido elevado de agregados al preparar los anticuerpos recombinantes. Por lo tanto, se sustituyó I (isoleucina) en la posición 117 desde la quinta M (metionina) como el aminoácido en la posición 1 que correspondía a un codón de inicio de traducción ATG en la secuencia de la región variable de cadena ligera de C2IgG1NS representada por SEC ID nº 47 por otros aminoácidos con el fin de preparar variantes. 40

Preparación de vector C2IgG1NS/I117N

45 Con el fin de preparar C2IgG1NS/I117N en el que la isoleucina en la posición 117 de la cadena ligera se había sustituido por asparagina, se prepararon diversos ADN mutantes codificantes de la sustitución de aminoácido utilizando el vector N5KG1-Val C2IgG1nS preparado en el Ejemplo 6 a modo de molde mediante el método de mutagénesis específica de sitio con un sistema de mutagénesis dirigida a sitio *in vitro* GeneEditor™ (Promega nº Q9280). 50

Se utilizó C2NS Lc 117I/HYND-p: (5'-TCAGTATGGT AGCTCACCTN ATTTCACTTT CGGCCCTGGG ACC-3' (N=A·T·G·C)(SEC ID nº 69)) como oligonucleótido (extremo 5' fosforilado) para la mutagénesis. Un oligonucleótido deseado para la mutagénesis y un oligonucleótido de selección adjunto en el kit anteriormente indicado se hibridaron con un ADN molde para sintetizar cadenas mutadas y después se seleccionó un mutante utilizando el hecho de que sólo crece el mutante en presencia de mezcla de selección de antibiótico GeneEditor™. Más concretamente, se incubó un molde de ADNc bajo condiciones alcalinas (NaOH 0,2 M, EDTA 0,2 mM (concentración final)) a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se añadió para la neutralización 1/10 volumen de acetato amónico 2 M (pH 4,6) y se recuperó el molde mediante precipitación con etanol. Al ADN molde, que había sido sometido a degeneración alcalina, se añadió un oligonucleótido para la mutagénesis, un nuevo oligonucleótido de selección (oligo Bottom Select, extremo 5' fosforilado 5'-CCGCGAGACC CACCCTTGGA GGCTCCAGAT TTATC-3' (SEC ID nº 85)) para la obtención de resistencia a antibióticos y se añadió un tampón de hibridación adjunto en el kit. La mezcla se mantuvo a 75°C durante 5 minutos y la temperatura se redujo lentamente a 37°C para la hibridación. A continuación, para la síntesis y la ligación de una cadena mutada, se añadió el tampón de síntesis 10x adjunto en el 60

5 kit, una ADN polimerasa de T4 y una ADN ligasa de T4 y lo resultante se dejó que reaccionase a 37°C durante 90 minutos. Se preparó un ADN plasmídico a partir de *E. coli* transformado obtenido mediante transformación de células BMH 71-18 mutS competentes en presencia de mezcla de selección de antibiótico GeneEditor™ y cultivo, y después se transformaron células ElectroMAX DH10B (Invitrogen nº 18290-015) con el ADN mediante electroporación y se inocularon en una placa LB que contenía la mezcla de selección de antibiótico GeneEditor™. El transformante generado en la placa se cultivó y el ADN plasmídico se purificó y se analizó la secuencia de nucleótidos de ADN. Basándose en el resultado referente a la secuencia de nucleótidos de ADN, se obtuvo un vector de expresión de C2IgG1NS mutante en el que se había introducido la mutación de un aminoácido deseado. El ADN plasmídico obtenido que expresaba la proteína mutante con una sustitución de aminoácido se denominó vector N5KG1-Val C2IgG1NS/117N.

Preparación de vector C2IgG1NS/117N

15 Con el fin de preparar C2IgG1NS/117C en el que la isoleucina en la posición 117 de la cadena ligera se había sustituido por cisteína, se prepararon diversos ADN mutantes codificantes mediante el método de mutagénesis específica de sitio con un sistema de mutagénesis dirigida a sitio *in vitro* GeneEditor™ (Promega nº Q9280) utilizando el vector N5KG1-Val C2IgG1NS preparado en el Ejemplo 6 a modo de molde.

20 Se utilizó C2NS Lc 117I/GRC-p(5'-TCAGTATGGT AGCTCACCTB GTTTCAC TTT CGGCCCTGGG ACC-3' (B=C · G · T) (SEC ID nº 70)) como oligonucleótido (extremo 5' fosforilado) para la mutagénesis. Un oligonucleótido deseado para la mutagénesis y un oligonucleótido de selección adjunto en el kit anteriormente indicado se hibridaron con un ADN molde para sintetizar cadenas mutadas y después se seleccionó un mutante utilizando el hecho de que sólo crece el mutante en presencia de mezcla de selección de antibiótico GeneEditor™. Más concretamente, se incubó un molde de ADNc bajo condiciones alcalinas (NaOH 0,2 M, EDTA 0,2 mM (concentración final)) a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se añadió para la neutralización 1/10 volumen de acetato amónico 2 M (pH 4,6) y se recuperó el molde mediante precipitación con etanol. Al ADN molde, que había sido sometido a degeneración alcalina, se añadió un oligonucleótido para la mutagénesis, un nuevo oligonucleótido de selección (oligo Bottom Select, extremo 5' fosforilado 5'-CCGCGAGACC CACCCTTGGG GGCTCCAGAT TTATC-3' (SEC ID nº 85)) para la obtención de resistencia a antibióticos y se añadió un tampón de hibridación al kit y después la mezcla se mantuvo a 75°C durante 5 minutos y la temperatura se redujo lentamente a 37°C para la hibridación. A continuación, para la síntesis y la ligación de una cadena mutada, se añadió el tampón de síntesis 10x adjunto en el kit, una ADN polimerasa de T4 y una ADN ligasa de T4 y lo resultante se dejó que reaccionase a 37°C durante 90 minutos. Se preparó un ADN plasmídico a partir de *E. coli* transformado obtenido mediante transformación de células BMH 71-18 mutS competentes en presencia de mezcla de selección de antibiótico GeneEditor™ y cultivo, y después se transformaron células ElectroMAX DH10B (Invitrogen nº 18290-015) con el ADN mediante electroporación y se inocularon en una placa LB que contenía la mezcla de selección de antibiótico GeneEditor™. El transformante generado en la placa se cultivó y el ADN plasmídico se purificó y se analizó la secuencia de nucleótidos de ADN. Basándose en el resultado referente a la secuencia de nucleótidos de ADN, se obtuvo un vector de expresión de C2IgG1NS mutante en el que se había introducido la mutación de un aminoácido deseado. El ADN plasmídico obtenido que expresaba la proteína mutante con una sustitución de aminoácido se denominó vector N5KG1-Val C2IgG1NS/117C.

Preparación de vector C2IgG1NS/117L

45 Se preparó C2IgG1NS/117L en el que se había sustituido la isoleucina en la posición 117 de la cadena ligera por leucina utilizando el vector N5KG1-Val C2IgG1NS preparado en el Ejemplo 6 a modo de molde mediante el método descrito posteriormente.

50 Para la amplificación del ADN se utilizó KOD-Plus de Toyobo. Se preparó una solución de reacción que presentaba una composición de 1 µl de ADNc, 5 µl de tampón 10xKOD-Plus, 5 µl de mezcla de dNTP, 1 µl de KOD-Plus, 2 µl de MgSO₄ 25 mM, un cebador directo y un cebador inverso en un volumen final de 50 µl utilizando agua doblemente destilada y se sometió a PCR.

55 Se sintetizó C2NS Lc 117IL R (5'-GGTCCCAGGG CCGAAAGTGA ATAGAGGTGA GCTACCATAC TGCTG -3' (SEC ID nº 71)), se utilizó C2NS Lc 117IL R y C2-1 Lc Bgl II F (5'-AGA GAG AGA GAT CTC TCA CCA TGG AAA CCC CAG CGCAGC TTC TCT TC -3' (SEC ID nº 18)), se utilizó N5KG1-Val C2IgG1NS a modo de molde y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. Este producto de amplificación por PCR se denominó C2NSI117L-F. A continuación, se utilizaron C2NS Lc 117IL F (5'-GCAGTATGGT AGCTCACCTC TATTCAC TTT CGGCCCTGGG ACC -3' (SEC ID nº 72)) y C2NS EcoRI R (5'-CCGGAATTCA AACTCTCCC CTGTTGAAGC TCTTTGTGAC GG -3' (SEC ID nº 73)), conjuntamente con el vector N5KG1-Val C2IgG1NS a modo de molde y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se

sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. Este producto de amplificación por PCR se denominó C2NSI117L-R. A continuación, se introdujeron 5 µl de C2NSI117L-F y C2NSI117L-R y se llevó a cabo la PCR sin cebador repitiendo 3 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos. Esta solución de reacción se calentó a 99°C durante 5 minutos y después se diluyó 5 veces, se utilizaron 5 µl de esta solución a modo de molde y se utilizaron los cebadores C2-1 Lc Bgl II F y C2NS EcoRI R y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. Dicho fragmento de ADNc amplificado por PCR se digirió con BglII y EcoRI y se introdujo en el vector N5KG1-Val Lark que había sido cortado con los mismos enzimas y contenía el gen de cadena pesada de C2 anteriormente indicado. Se determinó la secuencia de nucleótidos de ADN de la parte insertada y se confirmó que la secuencia que había sido amplificada por PCR e insertada era idéntica a la secuencia génica utilizada como molde. El ADN plasmídico obtenido que expresaba la proteína mutante con una sustitución de aminoácido se denominó vector N5KG1-Val C2lgG1NS/I117L.

Preparación de vector C2lgG1NS/I117M

Se preparó C2lgG1NS/I117M en el que se había sustituido la isoleucina en la posición 117 de la cadena ligera por metionina utilizando el vector N5KG1-Val C2lgG1NS preparado en el Ejemplo 6 a modo de molde mediante el método descrito posteriormente.

Para la amplificación del ADN se utilizó KOD-Plus de Toyobo. Se preparó una solución de reacción que presentaba una composición de 1 µl de ADNc, 5 µl de tampón 10xKOD-Plus, 5 µl de mezcla de dNTP, 1 µl de KOD-Plus, 2 µl de MgSO₄ 25 mM, un cebador directo y un cebador inverso en un volumen final de 50 µl utilizando agua doblemente destilada y se sometió a PCR.

Se sintetizó C2NS Lc 117IM R (5'-GGTCCCAGGG CCGAAAGTGA ACATAGGTGA GCTACCATAC TGCTG -3' (SEC ID nº 74)), se utilizó C2NS Lc 117IM R y C2-1 Lc Bgl II F (5'-AGA GAG AGA GAT CTC TCA CCA TGG AAA CCC CAG CGCAGC TTC TCT TC -3' (SEC ID nº 18)), se utilizó N5KG1-Val C2lgG1NS a modo de molde y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. Este producto de amplificación por PCR se denominó C2NSI117M-F. A continuación, se utilizaron C2NS Lc 117IM F (5'-GCAGTATGGT AGCTCACCTA TGTTCACTTT CGGCCCTGGG ACC -3' (SEC ID nº 75)) y C2NS EcoRI R (5'-CCGGAATTCA AACTCTCCC CTGTTGAAGC TCTTTGTGAC GG -3' (SEC ID nº 76)), conjuntamente con el vector N5KG1-Val C2lgG1NS a modo de molde y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. Dicho producto de amplificación por PCR se denominó C2NSI117M-R. A continuación, se introdujeron 5 µl de cada uno de C2NSI117M-F y C2NSI117M-R diluidos 2 veces y se repitió 3 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos en ausencia de un cebador. Dicha solución de reacción se calentó a 99°C durante 5 minutos y después se diluyó 5 veces; se utilizaron 5 µl de dicha solución a modo de molde conjuntamente con el cebador C2-1 Lc Bgl IIF y el cebador C2NS EcoRI R y se repitió 25 veces un ciclo de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos. Dicha solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y el producto de PCR amplificado se purificó mediante el kit de extracción en gel QIAquick. Dicho fragmento de ADNc amplificado por PCR se digirió con BglII y EcoRI y se introdujo en el vector N5KG1-Val Lark que había sido cortado con los mismos enzimas y contenía el gen de cadena pesada de C2 anteriormente indicado. Se determinó la secuencia de nucleótidos de ADN de la parte insertada y se confirmó que la secuencia que había sido amplificada por PCR e insertada era idéntica a la secuencia génica utilizada como molde. El ADN plasmídico obtenido que expresaba la proteína mutante con una sustitución de aminoácido se denominó vector N5KG1-Val C2lgG1NS/I117M.

Preparación de C2lgG1NS con modificación de aminoácidos

Mediante el método descrito en el Ejemplo 7 se introdujeron los vectores C2lgG1NS/I117L, C2lgG1NS/I117M, C2lgG1NS/I117N y C2lgG1NS/I117C en células FreeStyle293 (fabricadas por Invitrogen) siguiendo el manual de instrucciones adjunto para expresar anticuerpos recombinantes. El anticuerpo se purificó mediante el método descrito en el Ejemplo 8 del que se modificó una parte. El día 6, se recogió el sobrenadante de cultivo y se filtró a través de Steriflip-GP (Millipore, SCGP00525) para eliminar los contaminantes, tales como células y similares. El sobrenadante de cultivo que contenía el anticuerpo se purificó por afinidad utilizando proteína A (fabricado por Amersham), PBS como tampón de adsorción y tampón de citrato sódico 20 mM (pH 3,4) como tampón de elución. Las fracciones de elución se ajustaron a pH aproximadamente 5,5 mediante la adición de tampón de fosfato sódico 200 mM (pH 7,0). La solución de anticuerpos preparada se concentró a 3.000 rpm utilizando Vivaspin-6 (corte de PM 10 K Viva Science, VS0601), se añadió adicionalmente PBS y la mezcla se centrifugó con el fin de obtener

anticuerpo purificado sustituido por PBS. La concentración del anticuerpo purificado se obtuvo midiendo la absorbancia a 280 nm y convirtiendo el valor medido como 1,45 x densidad óptica en mg/l.

Medición del contenido de agregados de C2IgG1NS con modificación de aminoácidos

5 Se midió el contenido de agregados de los anticuerpos purificados respectivos utilizando 10 µg (0,1 mg/ml) de anticuerpos modificados con aminoácidos.

10 Se analizó el contenido de agregados de la solución de anticuerpos mediante la utilización de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento (fabricado por Shimadzu), columna TSK-G3000 SW (fabricada por Toso) y fosfato sódico 20 mM y NaCl 500 mM, pH 7,0, a modo de solventes. Se compararon las posiciones de la elución con un marcador molecular para la HPLC de filtración en gel (fabricada por Oriental Yeast) (nº de cat. 40403701) para identificar el monómero y los agregados de la proteína anticuerpo y se calculó el contenido de agregado a partir de las áreas correspondientes de los picos.

15 Se muestran los resultados en la fig. 15. La fig. 15 muestra que el contenido de agregado se redujo mediante las modificaciones de aminoácidos indicadas anteriormente.

Medición del contenido de agregados de C2IgG1NS con modificación de aminoácidos

20 Reactividades de los anticuerpos C2IgG1NS con modificación de aminoácidos con una línea celular tumoral, la línea celular de expresión forzada de CD98 humana/LAT1 humana, y CEAH mediante FACS según los métodos descritos en los Ejemplos 14 y 15.

25 Se muestran los resultados en las figs. 16A y 16B. Los anticuerpos modificados con aminoácidos anteriormente indicados, especialmente C2IgG1NS/I117L, se unieron a células L929 que expresaban forzosamente CD98 humana y LAT1 humana, pero no se unieron a L929 no tratadas (fig. 16A). Además, dichos anticuerpos modificados con aminoácidos no se unían a CEAH pero sí se unían a diversas células de cáncer, tales como Colo205, Ramos y DLD-1 (fig. 16B).

30 Debido a que dichos resultados son similares a la propiedad de unión de C2IgG1 mostrado en la fig. 2A y en la fig. 8, se considera que los anticuerpos modificados con aminoácidos anteriormente indicados, especialmente C2IgG1NS/I117L, presentan un bajo contenido de agregados, presentan una especificidad de unión a las células de cáncer de manera similar a C2IgG1 y se podría esperar que muestren una actividad antitumoral de manera similar a C2IgG1.

35 <Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C2IgG1NS modificada con aminoácidos (idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C2IgG1)> (SEC ID nº 43)

**STTMKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGG
SISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTS
40 KSQFFLKLSSVTAADTAVYYCARQGTGLALFDYWGQGTLVTVSS**

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de C2IgG1NS modificado con aminoácidos (idéntica a la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de C2IgG1NS)> (SEC ID nº 42)

**GTCGACCACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGG
CTCCCAGATGGGTCTGTCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCA
GGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTC
TGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTACTACTGGGGCTGGATCCGCCA
GCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGTG
GGAGTACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCG
TAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC
GCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAGGGACGGGGC
TCGCCCTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT
45 CA**

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C2IgG1NS/117IL> (SEC ID nº 77)

**RSLTMETPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPG TLSLSPGERATLSCRASQ
SVSSSFLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI
SRLEPEDFAVYYCQYGS SPLFTFGPGTKVDIK**

5

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de C2IgG1NS/117IL> (SEC ID nº 78)

**AGATCTCTCACCATGGAAACCC CAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTA
CTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA
GGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG
GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGA
AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT CGCAGTGT
ATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCTATTCACTTT CGGCCCTGG
GACCAAAGTGGATATCAAA**

10

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C2IgG1NS/117IXM> (SEC ID nº 79)

**RSLTMETPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPG TLSLSPGERATLSCRASQ
SVSSSFLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI
SRLEPEDFAVYYCQYGS SPMFTFGPGTKVDIK**

15

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de C2IgG1NS/117IM> (SEC ID nº 80)

**AGATCTCTCACCATGGAAACCC CAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTA
CTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA
GGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG
GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGA
AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT CGCAGTGT
ATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTATGTTCACTTT CGGCCCTGG
GACCAAAGTGGATATCAAA**

20

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C2IgG1NS/117IN> (SEC ID nº 81)

**RSLTMETPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPG TLSLSPGERATLSCRASQ
SVSSSFLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI
SRLEPEDFAVYYCQYGS SPNFTFGPGTKVDIK**

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de C2IgG1NS/117IN> (SEC ID nº 82)

AGATCTCTCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTA
CTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA
GGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG
GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGA
AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCGAGTGT
ATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTAATTTCACTTTTCGGCCCTGG
GACCAAAGTGGATATCAAA

<Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C2IgG1NS/117IC> (SEC ID nº 83)

RSLTMETPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQ
SVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI
5 SRLEPEDFAVYYCQYGSSTPCFTFGPGTKVDIK

<Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de C2IgG1NS/117IC> (SEC ID nº 84)

AGATCTCTCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTA
CTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA
GGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG
GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGA
AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCGAGTGT
ATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTTGTTCCTTTTCGGCCCTGG
10 GACCAAAGTGGATATCAAA

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> KIRIN BREWERY COMPANY, LIMITED

<120> Nuevo anticuerpo anti-CD98
<130> 165882

20 <150> JP 2006-105013
<151> 2006-04-06

<160> 85

25 <170> Patent In versión 3.3

<210> 1
<211> 26
<212> ADN
30 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

ES 2 489 641 T3

<400> 1
gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc 26

5 <210> 2
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 2

15 aggcacacaa cagaggcagt tccagattc 30

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

25 <400> 3

attaaccctc actaaagga 20

<210> 4
30 <211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> Cebador

<400> 4

agagagagag atctctcacc atggaagccc cagctcagct totct 45

40 <210> 5
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Cebador

<400> 5

50 agagagagag cgtacgttta atetcoagtc ggtccattg gc 42

<210> 6
<211> 31
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

60 <400> 6

tctgtccac cttggtgtg ctgggcttg g 31

<210> 7
<211> 31
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

10 <400> 7

tgcacgccgc tggcagggc gcctgagttc c 31

<210> 8
15 <211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> Cebador

<400> 8

gctggagggc acggtcacca cgctg 25

25 <210> 9
<211> 50
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 9

35 agagagagag gtcgaccacc atggggtcaa ccgccatcct cgccctctc

<210> 10
40 <211> 39
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
45 <223> Cebador

<400> 10

agagagagag gctagctgag gagacggtga ccagggttc 39

50 <210> 11
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> Cebador

<400> 11

60 agagagagag gtcgaccacc atggagttg ggctgagctg ggttt 45

<210> 12
<211> 42

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 12

 agagagagag cgtacgttg attccacct tggcccctg gc
 10
 <210> 13
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 13
 20
 gtaaacgac ggccag 16

 <210> 14
 <211> 17
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 30
 <400> 14

 caggaaacag ctatgac 17
 35
 <210> 15
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 15
 45 agagagagag atctctcacc atggaaacc cagcgcagct tctctc

 <210> 16
 <211> 40
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 55
 <400> 16

 agagagagag cgtacgttg atctccagct tggcccctg 40
 60
 <210> 17
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 17

5 agagagagag gtcgaccac catggactgg agcatcctt t 41

<210> 18
<211> 47
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 18

20 agagagagag atctctacc atggaaacc cagcgagct tctctc 47

<210> 19
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 19

30 agagagagag cgtacgttg atatccactt tggcccagg g 41

<210> 20
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Cebador

<400> 20

ggcgaagacc cggatggcta tgtc 24

45 <210> 21
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Cebador

<400> 21

55 aaaccctgg cctggcagat gagc 24

<210> 22
<211> 49
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Cebador

<400> 22
5 agagagagag gtcgaccacc atgaagcacc tgtggttctt octcctgct 49
<210> 23
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
10 <220>
<223> Cebador
<400> 23
15 cgtccaagaa ccagttctcc ctgaagctga 30
<210> 24
<211> 30
20 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
25 <400> 24
tcagcttcag ggagaactgg ttcttgacg 30
30 <210> 25
<211> 54
<212> ADN
<213> Artificial
35 <220>
<223> Cebador
<400> 25
40 caccggttcg gggaagtagt ccttgacgag gcagcaaacg gccacgctgc tcgt
<210> 26
<211> 54
<212> ADN
45 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador
50 <400> 26
acgagcagcg tggccgttgg ctgcctcgtc aaggactact tccccgaacc ggtg
<210> 27
55 <211> 39
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
60 <223> Cebador
<400> 27

ES 2 489 641 T3

cgcgatcct catcattac ccggagacag ggagaggct 39

<210> 28
 <211> 434
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Región variable de cadena P del anticuerpo K3

10

<400> 28

```

agagagagag gtgaccacc atgggggtcaa cggccatcct cggcctcctc ctggctgltc 60
tccaaggagt ctgtgccgag gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaagtg aaaaagcccg 120
gggagtctct gaagatctcc tgtaagggtt ctggatacag gtttaccgac tactggatcg 180
gctgggtgog ccagatgcco gggaaaggcc tggagtggat ggggatcttc tatcctggtg 240
actctgatgc cagatacagc ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaagt 300
ccatcaaacac cgcctacctg cagtggagca gcctgaaggo ctoggacacc gccatgtatt 360
attgtgcgag acggcgagat atagtgggag gtactgacta ctggggccag ggaaccctgg 420
tcaccgtctc ctca 434
    
```

15 <210> 29
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Región variable de cadena P del anticuerpo K3

<400> 29

```

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

25 Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

ES 2 489 641 T3

	20		25		30										
Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Arg	Phe
		35					40					45			
Thr	Asp	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Phe	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Ala	Arg	Tyr	Ser
	65				70					75					80
Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Asn
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Arg	Asp	Ile	Val	Gly	Gly	Thr	Asp	Tyr	Trp
		115					120					125			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
	130					135									

<210> 30
 <211> 398
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región variable de cadena L del anticuerpo K3

10

<400> 30

agagagagag atctctcacc atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct	60
ggctcccaga taccacogga gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt	120
ctccagggga aagagccacc ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag	180
actggtacca acagaaacct gggcaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccagca	240
gggocactgg catccagcc aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcaetctca	300
ccatcagcag cctagagcct gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact	360
ggatcacott cggccaaggg acacgactgg agattaa	398

15 <210> 31
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> región variable de cadena L del anticuerpo K3

<400> 31

ES 2 489 641 T3

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Ser Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110
 Asn Trp Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

5 <210> 32
 <211> 437
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena P del anticuerpo 1-40-1

<400> 32

agagagagag gtogaccacc atggagttg ggotgagctg ggttttcctt gttgctatt 60
 taaaagggtgt ccagtgtag gtgcagctgg tggagtctgg gggaggtgtg gtacggcctg 120
 ggggtccct gagactctc tgtgcagcct ctggattoac ctttgatgat tatggcatga 180
 cctgggtcog ccaagctcca ggaaggggc tggagtgggt ctctactatt agttggaatg 240
 gtggtggcac aggttatgca gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg 300
 ccaagaactc cctgtatctg caaatgaaca gtctgagagc cgaggacacg gcottgtatt 360
 actgtgoggg atattgtatt atacoggcot gctatgogga ctactggggc cagggaaacc 420
 tggtcaccgt ctctca 437

15 <210> 33
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Región variable de cadena P del anticuerpo 1-40-1

25 <400> 33

ES 2 489 641 T3

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Asp Asp Tyr Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Gly Gly Gly Thr Gly Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Cys Ile Ile Thr Gly Cys Tyr Ala Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

5 <210> 34
 <211> 398
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> región variable de cadena L del anticuerpo 1-40-1

<400> 34

agagagagag atctctcacc atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgotactct 60
 ggctcccaga taccacogga gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt 120
 ctccagggga aagagccacc ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag 180
 cctggtacca acagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca 240
 gggccactgg catccagcc aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttoactctca 300
 ccatcagcag cctagagcct gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact 360
 ggtggacglt cggccaaggg accaaggtgg aaatcaaa 398

15 <210> 35
 <211> 126
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena L del anticuerpo 1-40-1

ES 2 489 641 T3

<400> 35

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

5 <210> 36
 <211> 431
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena P del anticuerpo 3-69-6

<400> 36

gtgacccac catggactgg acctggagca tccttttctt ggtggcagca gcaacagggtg 60
 cccactccca ggttcaactg gtgcagtctg gagctgaggt gaagaagcct ggggcctcag 120
 tgaaggctctc ctgtaaggot totggttaca cctttaccag ctatggtatc agctggatgc 180
 gacaggcccc tggacaaggg cttgagtgga tgggatggat cagcgettac aatgtaata 240
 cgaactatgt acagaagtto caggacagag tcacatgac cagagacaca tccacgagca 300
 cagcctacat ggagctgagg agcotgagat ctgacgacac ggccgtgtat tactgtgcga 360
 gagatcgggg cagcaattgg tatgggtggt tcgaccctg gggccaggga acctgtgtca 420
 ccgtctctc a 431

15 <210> 37
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena P del anticuerpo 3-69-6

25 <400> 37

ES 2 489 641 T3

Arg Arg Pro Thr Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Thr Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 20 25 30
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 35 40 45
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Met Arg Gln Ala Pro
 50 55 60
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn
 65 70 75 80
 Thr Asn Tyr Val Gln Lys Phe Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
 85 90 95
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
 100 105 110
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Ser Asn Trp Tyr
 115 120 125
 Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

5 <210> 38
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena L del anticuerpo 3-69-6

<400> 38

agatctctca ccatggaaac cccagcgcag ctctcttcc tctgtctact ctggctccca 60
 gataccoacg gagaaattgt gttgacgcag totccaggca ccotgtcttt gtctccaggg 120
 gaaagagcca ccctctcctg cagggccagt cagagtgtta gcagcagcta cttagcctgg 180
 taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctcatct atgggtgcate cagcagggcc 240
 actggcatcc cagacaggtt cagtggcagt gggctctggga cagacttcac tctcaccatc 300
 agcagactgg agcctgaaga ttttgagtg tattactgtc agcagtatgg tagctcgtac 360
 acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 393

15 <210> 39
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 489 641 T3

<220>

<223> Región variable de cadena L del anticuerpo 3-69-6

5 <400> 39

Arg Ser Leu Thr Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 20 25 30
 Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 35 40 45
 Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
 65 70 75 80
 Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

<210> 40

<211> 427

10 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena P del anticuerpo C2IgG1

15

<400> 40

gtcgaccacc atgaagcacc tgtggttctt cotcctgctg gtggcggctc ccagatgggt 60
 cctgtcccag ctgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagacct 120
 gtccctcacc tgcactgtct ctgggtggctc cafcagcagt agtagttact actggggctg 180
 gatccgccag cccccagga aggggctgga gtggattggg agtatctatt atagtgggag 240
 tacctactac aaccctccc tcaagagtcg agtcaccata tccgtagaca cgtccaagag 300
 ccagttcttc ctgaagctga gctctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc 360
 gagacaaggg acggggctog coctatttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt 420
 ctctctca 427

20 <210> 41

ES 2 489 641 T3

<211> 142
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Región variable de cadena P del anticuerpo C2IgG1
 <400> 41

Ser Thr Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala
 1 5 10 15
 Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
 20 25 30
 Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
 35 40 45
 Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro
 50 55 60
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
 85 90 95
 Thr Ser Lys Ser Gln Phe Phe Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala
 100 105 110
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Thr Gly Leu Ala Leu
 115 120 125
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

10 <210> 42
 <211> 427
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Región variable de cadena P del anticuerpo C2IgG1NS

20 <400> 42

gtcgaccacc atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatgggt 60
 cctgtcccag ctgcagctgc aggagtcggg ccaggaactg gtgaagcctt cggagaccct 120
 gtccctcacc tgcactgtct ctggtggctc oatcagcagt agtagttaact actggggctg 180
 gatcggccag cccccaggga aggggctgga gtggattggg agtatctatt atagtgggag 240
 tacctactac aaccctccc tcaagagctg agtcaccata tccgtagaca cgtccaagaa 300
 ccagttctcc ctgaagctga gctctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc 360
 gagacaaggg acggggctcg cctatttga ctactggggc caggggaacc tggtcaccgt 420
 ctctca 427

ES 2 489 641 T3

<210> 43
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Región variable de cadena P del anticuerpo C2IgG1NS

<400> 43

10

```

Ser Thr Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala
 1          5          10          15

Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
          20          25          30

Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
          35          40          45

Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro
 50          55          60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser
 65          70          75          80

Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
          85          90          95

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala
          100          105          110

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Thr Gly Leu Ala Leu
          115          120          125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130          135          140
    
```

<210> 44
 <211> 505
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Secuencia parcial del anticuerpo G2I μ G1 entre la región variable de cadena P y el sitio de unión a IgG1

20

<400> 44

gtcgaccacc atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatgggt 60

ES 2 489 641 T3

cctgtcccag ctgcagctgc aggagtoggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct 120
 gtccctcacc tgcactgtct ctgggtggctc catcagcagt agtagttact actggggctg 180
 gatccgccag cccccagga aggggtgga gtggattggg agtatctatt atagtgggag 240
 tacctactac aaccogtccc tcaagagtgc agtcaccata tccgtagaca cgtcoaagag 300
 ccagttcttc ctgaagctga gctctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc 360
 gagacaaggg acggggctcg ccctatttga ctactggggc caggaacco tggtcaccgt 420
 ctctcaggg agtgcacccg ccccaacct tttcccctc gtctcctgtg agaattccc 480
 gtcggatacg agcagcgtgg ccgtt 505

<210> 45
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia parcial del anticuerpo C2I μ G1 entre la región variable de la cadena P y el sitio de unión a IgG1

10

<400> 45

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

ES 2 489 641 T3

<210> 46
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Región variable de cadena L del anticuerpo C2lgG1 ó C2lg m G1

<400> 46

10

```

agatctctca ccattgaaac cccagcgcag cttctcttcc tctgtctact ctggtccca      60
gataccaccg gagaaattgt gttgacgcag tctccaggca ccctgtcttt gtctccaggg      120
gaaagagcca cccctctcctg cagggccagt cagagtgtta gcagcagctt cttagcctgg      180
taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctctatct atggtgcato cagcagggcc      240
actggcatcc cagacaggtt cagtggcagt gggctctggga cagacttcac tctcaccato      300
agcagactgg agcctgaaga tttcgcagtg tattactgtc agcagtatgg tagctcacct      360
atattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa      399
    
```

<210> 47
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Región variable de cadena L del anticuerpo G2lgG1 ó C2lg m G1

20

<400> 47

```

Arg Ser Leu Thr Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu
 1           5           10           15
Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 20           25           30
Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 35           40           45
Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 50           55           60
Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
 65           70           75           80
Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85           90           95
Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
100           105           110
Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
115           120           125
Lys Val Asp Ile Lys
130
    
```

<210> 48
 <211> 864

25

ES 2 489 641 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Secuencia de una inserción que contiene regiones variables y sitios de restricción en K3/pCR4

<400> 48

```

agagagagag atctctcacc atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctaactct    60
ggctcccaga taccaccogga gaaatigtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt    120
ctccagggga aagagccacc ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag    180
actggtacca acagaaaact ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccagca    240
gggccaactgg catcccagcc aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca    300
ccatcagcag cotagagcct gaagattitg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact    360
ggatcacctt cggccaaggg acacgactgg agattaaacg tacgctctct ctctagagag    420
agaggtcgac caccatgggg tcaaccgcca tcctcgcctt cctcctggct gttctccaag    480
gagtctgtgc cgaggtcag ctggtgcagt ctggagcaga agtgaaaaag cccggggagt    540
ctotgaagat ctctgtgaag ggttotggat acaggtttac cgactactgg atcggctggg    600
tgcgccagat gcccgggaaa ggcctggagt ggatggggat cttctatcct ggtgactctg    660
atgccagata cagcccgtcc ttccaaggcc aggtcaccat ctcagccgac aagtccatca    720
acaccgccta cctgcagtgg agcagcctga aggcctcgga caccgccatg tattattgtg    780
cgagacggcg agatatagtg ggaggtactg actactgggg ccaggaacc ctggtcaccg    840
tctctcagc tagcctctct ctct                                            864

```

10 <210> 49
<211> 876
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia de una inserción que contiene regiones variables y sitios de restricción en C2lgG1/pCR4

20 <400> 49

agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct 60
 ggctcccaga taccaccgga gaaattgtgt tgaccgagtc tocaggcacc ctgtctttgt 120
 ctccagggga aagagccacc ctctcctgca gggccagtca gagtgtiagc agcagcttct 180
 tagcctggta ccagcagaaa cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca 240
 gcagggccac tggcatcca gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc 300
 tcaccatcag cagactggag cctgaagatt tcgcagtgtta ttactgtcag cagtatggta 360
 gctcacctat attcactttc ggccctggga ccaaagtga tatcaaactg acgctctctc 420
 tctagagaga gaggtcgacc accatgaagc acctgtggtt cttcctcctg ctggtggcgg 480
 ctccagatg ggtcctgtcc cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc 540
 cttcggagac cotgtccctc acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtagtagtt 600
 actactgggg ctggatccgc cagcccccag ggaaggggt ggagtggatt gggagtatct 660
 attatagtgg gactacctac tacaaccctg cctcaagag tcgagtcacc atatccgtag 720
 acacgtcaa gagccagttc ttcctgaagc tgagctctgt gaccgcccga gacacggctg 780
 tgtattactg tgcgagacaa gggacggggc tcgccctatt tgactactgg ggcagggaa 840
 ccctggtcac cgtctctca gctagcctct ctctct 876

5 <210> 50
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 50
 ccggaattcc cacatgagc caggacaccg aggtggatat ga 42

15 <210> 51
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 51
 aaggaaaaaa gcggccgctc atcaggccgc gtaggggaag cggagcagca g 51

25 <210> 52
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 52
 ccggaattcc cacatgagc caggacaccg aagtgacat gaaa 44

35 <210> 53
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador
 5
 <400> 53
 aaggaaaaaa gcggccgctc atcaggccac aaaggggaac tgtaacagca 50
 <210> 54
 10 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 54
 tcattctgga ccttactccc aactacc 27
 20 <210> 55
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 55
 30 gtagtggg agtaaggcc agaatga 27
 <210> 56
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 56
 40 tgctctcac cctgccagg acccctgtt t 31
 <210> 57
 <211> 31
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 57
 aaaacagggg tcctggcag ggtgaagac a 31
 <210> 58
 <211> 44
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 58
 agagagagag gctagctgag gagacggtga ccagggttcc ctgg 44

<210> 59
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 59
 10 ccggaattcc caccatgagc caggacaccg aggtggatat ga 42
 <210> 60
 <211> 51
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 60
 aaggaaaaa gcggccgctc atcaggccgc gtaggggaag cggagcagca g 51
 <210> 61
 <211> 45
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 61
 agtctcttcg aatcggctaa gaagaagagc atccgtgtca ttctg 45
 <210> 62
 <211> 45
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador
 <400> 62
 cagaatgaca cggatgctct tcttcttagc cgattcaag agact 45
 45 <210> 63
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 63
 55 ccggaattcc caccatggcg ggtgcgggcc cgaagcggc 39
 <210> 64
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador

<400> 64
 cggggtaccg tctctgggg gaccacctgc atgagcttc 39

5 <210> 65
 <211> 1879
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (112)..(1698)

<400> 65

ctgcgcggag gcacagaggc cggggagagc gttctgggtc cgagggtcca gtaggggtt 60

gagccaccat ctgaccgcaa gctgcgtcgt gtogccggtt ctgcaggcac c atg agc 117
 Met Ser
 1

cag gac acc gag gtg gat atg aag gag gtg gag ctg aat gag tta gag 165
 Gln Asp Thr Glu Val Asp Met Lys Glu Val Glu Leu Asn Glu Leu Glu
 5 10 15

ccc gag aag cag ccg atg aac gcg gcg tct ggg gcg gcc atg tcc ctg 213
 Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala Ser Gly Ala Ala Met Ser Leu
 20 25 30

gcg gga gcc gag aag aat ggt ctg gtg aag atc aag gtg gcg gaa gac 261
 Ala Gly Ala Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Lys Val Ala Glu Asp
 35 40 45 50

gag gcg gag gcg gca gcc gcg gct aag ttc acg gcc ctg tcc aag gag 309
 Glu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Phe Thr Gly Leu Ser Lys Glu
 55 60 65

gag ctg ctg aag gtg gca gcc agc ccc gcc tgg gta cgc acc cgc tgg 357
 Glu Leu Leu Lys Val Ala Gly Ser Pro Gly Trp Val Arg Thr Arg Trp
 70 75 80

gca ctg ctg ctg ctc ttc tgg ctc gcc tgg ctc gcc atg ctt gct ggt 405
 Ala Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu Gly Trp Leu Gly Met Leu Ala Gly
 85 90 95

gcc gtg gtc ata atc gtg cga gcg ccg cgt tgt cgc gag cta ccg gcg 453
 Ala Val Val Ile Ile Val Arg Ala Pro Arg Cys Arg Glu Leu Pro Ala
 100 105 110

cag aag tgg igg cac acg gcc gcc ctc tac cgc atc gcc gac ctt cag 501
 Gln Lys Trp Trp His Thr Gly Ala Leu Tyr Arg Ile Gly Asp Leu Gln
 115 120 125 130

gcc ttc cag gcc cac gcc gcg gcc aac ctg gcg ggt ctg aag ggg cgt 549
 Ala Phe Gln Gly His Gly Ala Gly Asn Leu Ala Gly Leu Lys Gly Arg

15

ES 2 489 641 T3

	135	140	145	
ctc gat tac ctg agc tot ctg aag gtc aag ggc ctt gtg ctg ggt oca				597
Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Leu Lys Val Lys Gly Leu Val Leu Gly Pro	150	155	160	
att cac aag aac cag aag gat gat gtc gct cag act gac ttg ctg cag				645
Ile His Lys Asn Gln Lys Asp Asp Val Ala Gln Thr Asp Leu Leu Gln	165	170	175	
atc gac ccc aat ttt ggc tcc aag gaa gat ttt gac agt ctc ttg oca				693
Ile Asp Pro Asn Phe Gly Ser Lys Glu Asp Phe Asp Ser Leu Leu Gln	180	185	190	
tog gct aaa aaa aag agc atc cgt gtc att ctg gac ctt act ccc aac				741
Ser Ala Lys Lys Lys Ser Ile Arg Val Ile Leu Asp Leu Thr Pro Asn	195	200	205	210
tac cgg ggt gag aac tog tgg ttc tcc act cag gtt gac act gtg gcc				789
Tyr Arg Gly Glu Asn Ser Trp Phe Ser Thr Gln Val Asp Thr Val Ala	215	220	225	
acc aag gtg aag gat gct ctg gag ttt tgg ctg caa gct ggc gtg gat				837
Thr Lys Val Lys Asp Ala Leu Glu Phe Trp Leu Gln Ala Gly Val Asp	230	235	240	
ggg ttc cag gtt cgg gac ata gag aat ctg aag gat gca tcc tca ttc				885
Gly Phe Gln Val Arg Asp Ile Glu Asn Leu Lys Asp Ala Ser Ser Phe	245	250	255	
ttg gct gag tgg caa aat atc acc aag ggc ttc agt gaa gac agg ctc				933
Leu Ala Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Gly Phe Ser Glu Asp Arg Leu	260	265	270	
ttg att gcg ggg act aac tcc tcc gac ctt cag cag atc ctg agc cta				981
Leu Ile Ala Gly Thr Asn Ser Ser Asp Leu Gln Gln Ile Leu Ser Leu	275	280	285	290
ctc gaa tcc aac aaa gac ttg ctg ttg act agc tca tac ctg tct gat				1029
Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Leu Ser Asp	295	300	305	
tct ggt tct act ggg gag cat aca aaa tcc cta gtc aca cag tat ttg				1077
Ser Gly Ser Thr Gly Glu His Thr Lys Ser Leu Val Thr Gln Tyr Leu	310	315	320	
aat gcc act ggc aat cgc tgg tgc agc tgg agt ttg tct cag gca agg				1125
Asn Ala Thr Gly Asn Arg Trp Cys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Ala Arg	325	330	335	
ctc ctg act tcc ttc ttg cgg gct caa ctt ctc cga ctc tac cag ctg				1173
Leu Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ala Gln Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Leu	340	345	350	
atg ctc ttc acc ctg cca ggg acc cct gtt ttc agc tac ggg gat gag				1221
Met Leu Phe Thr Leu Pro Gly Thr Pro Val Phe Ser Tyr Gly Asp Glu	355	360	365	370
att ggc ctg gat gca gct gcc ctt cct gga cag cct atg gag gct cca				1269
Ile Gly Leu Asp Ala Ala Ala Leu Pro Gly Gln Pro Met Glu Ala Pro	375	380	385	
gtc atg ctg tgg gat gag tcc agc ttc cct gac atc cca ggg gct gta				1317
Val Met Leu Trp Asp Glu Ser Ser Phe Pro Asp Ile Pro Gly Ala Val	390	395	400	
agt gcc aac atg act gtg aag ggc cag agt gaa gac cct ggc tcc ctc				1365
Ser Ala Asn Met Thr Val Lys Gly Gln Ser Glu Asp Pro Gly Ser Leu	405	410	415	
ctt tcc ttg ttc cgg cgg ctg agt gac cag cgg agt aag gag ogc tcc				1413
Leu Ser Leu Phe Arg Arg Leu Ser Asp Gln Arg Ser Lys Glu Arg Ser	420	425	430	
cta ctg cat ggg gac ttc cac gcg ttc tcc gct ggg cct gga ctc ttc				1461
Leu Leu His Gly Asp Phe His Ala Phe Ser Ala Gly Pro Gly Leu Phe				

ES 2 489 641 T3

```

435              440              445              450
tcc tat atc cgc cac tgg gac cag aat gag cgt ttt ctg gta gtg ctt 1509
Ser Tyr Ile Arg His Trp Asp Gln Asn Glu Arg Phe Leu Val Val Leu
                    455                    460                    465

aac ttt ggg gat gtg ggc ctc tcg gct gga ctg cag gcc tcc gac ctg 1557
Asn Phe Gly Asp Val Gly Leu Ser Ala Gly Leu Gln Ala Ser Asp Leu
                    470                    475                    480

cct gcc agc gcc agc ctg cca gcc aag gct gac ctc ctg ctc agc acc 1605
Pro Ala Ser Ala Ser Leu Pro Ala Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ser Thr
                    485                    490                    495

cag cca gcc cgt gag gag gcc tcc cct ctt gag ctg gaa cgc ctg aaa 1653
Gln Pro Gly Arg Glu Glu Gly Ser Pro Leu Glu Leu Glu Arg Leu Lys
                    500                    505                    510

ctg gag cct cac gaa ggg ctg ctg ctc cgc ttc ccc tac gcg gcc 1698
Leu Glu Pro His Glu Gly Leu Leu Leu Arg Phe Pro Tyr Ala Ala
515                    520                    525

tgacttcagc ctgacatgga cccactacco ttctcctttc cttccaggc cotttgctt 1758

ctgatttttc tcttttttaa aaacaaacaa acaaactggt gcagattatg agtgaacccc 1818

caaatagggt gttttctgcc ttcaaataaa agtcaccocct gcatggtgaa gtcttcctc 1878
t 1879

```

<210> 66
 <211> 529
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66

```

Met Ser Gln Asp Thr Glu Val Asp Met Lys Glu Val Glu Leu Asn Glu
1              5              10              15

Leu Glu Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala Ser Gly Ala Ala Met
20              25              30

Ser Leu Ala Gly Ala Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys Ile Lys Val Ala
35              40              45

Glu Asp Glu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Phe Thr Gly Leu Ser
50              55              60

Lys Glu Glu Leu Leu Lys Val Ala Gly Ser Pro Gly Trp Val Arg Thr
65              70              75              80

Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu Gly Trp Leu Gly Met Leu
85              90              95

Ala Gly Ala Val Val Ile Ile Val Arg Ala Pro Arg Cys Arg Glu Leu
100             105             110

Pro Ala Gln Lys Trp Trp His Thr Gly Ala Leu Tyr Arg Ile Gly Asp
115             120             125

Leu Gln Ala Phe Gln Gly His Gly Ala Gly Asn Leu Ala Gly Leu Lys
130             135             140

Gly Arg Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Leu Lys Val Lys Gly Leu Val Leu
145             150             155             160

```

10

ES 2 489 641 T3

Gly Pro Ile His Lys Asn Gln Lys Asp Asp Val Ala Gln Thr Asp Leu
 165 170 175

Leu Gln Ile Asp Pro Asn Phe Gly Ser Lys Glu Asp Phe Asp Ser Leu
 180 185 190

Leu Gln Ser Ala Lys Lys Lys Ser Ile Arg Val Ile Leu Asp Leu Thr
 195 200 205

Pro Asn Tyr Arg Gly Glu Asn Ser Trp Phe Ser Thr Gln Val Asp Thr
 210 215 220

Val Ala Thr Lys Val Lys Asp Ala Leu Glu Phe Trp Leu Gln Ala Gly
 225 230 235 240

Val Asp Gly Phe Gln Val Arg Asp Ile Glu Asn Leu Lys Asp Ala Ser
 245 250 255

Ser Phe Leu Ala Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Gly Phe Ser Glu Asp
 260 265 270

Arg Leu Leu Ile Ala Gly Thr Asn Ser Ser Asp Leu Gln Gln Ile Leu
 275 280 285

Ser Leu Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Leu
 290 295 300

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

Tyr Leu Asn Ala Thr Gly Asn Arg Trp Cys Ser Trp Ser Leu Ser Gln
 325 330 335

Ala Arg Leu Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ala Gln Leu Leu Arg Leu Tyr
 340 345 350

Gln Leu Met Leu Phe Thr Leu Pro Gly Thr Pro Val Phe Ser Tyr Gly
 355 360 365

Asp Glu Ile Gly Leu Asp Ala Ala Ala Leu Pro Gly Gln Pro Met Glu
 370 375 380

Ala Pro Val Met Leu Trp Asp Glu Ser Ser Phe Pro Asp Ile Pro Gly
 385 390 395 400

Ala Val Ser Ala Asn Met Thr Val Lys Gly Gln Ser Glu Asp Pro Gly
 405 410 415

Ser Leu Leu Ser Leu Phe Arg Arg Leu Ser Asp Gln Arg Ser Lys Glu
 420 425 430

Arg Ser Leu Leu His Gly Asp Phe His Ala Phe Ser Ala Gly Pro Gly
 435 440 445

Leu Phe Ser Tyr Ile Arg His Trp Asp Gln Asn Glu Arg Phe Leu Val
 450 455 460

Val Leu Asn Phe Gly Asp Val Gly Leu Ser Ala Gly Leu Gln Ala Ser
 465 470 475 480
 Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Leu Pro Ala Lys Ala Asp Leu Leu Leu
 485 490 495
 Ser Thr Gln Pro Gly Arg Glu Glu Gly Ser Pro Leu Glu Leu Glu Arg
 500 505 510
 Leu Lys Leu Glu Pro His Glu Gly Leu Leu Leu Arg Phe Pro Tyr Ala
 515 520 525

Ala

<210> 67
 <211> 4539
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (66).. (1586)

10

<400> 67

cgggcgcgac actgctcgct gggccgcggc tccgggtgt cccaggcccg gccggtgcgc 60
 agagc atg gcg ggt cgc gcc cgg aag cgg cgc cta gcg gcg ccg gcg 110
 Met Ala Gly Ala Gly Pro Lys Arg Arg Ala Leu Ala Ala Pro Ala
 1 5 10 15
 gcc gag gag aag gaa gag cgc cgg gag aag atg ctg gcc gcc aag agc 158
 Ala Glu Glu Lys Glu Glu Ala Arg Glu Lys Met Leu Ala Ala Lys Ser
 20 25 30
 gcg gac gcc tcg gcg ccg gca gcc gag gcc gag gcc gtg acc ctg cag 206
 Ala Asp Gly Ser Ala Pro Ala Gly Glu Gly Glu Gly Val Thr Leu Gln
 35 40 45
 cgg aac atc acg ctg ctc aac gcc gtg gcc atc atc gtg ggg acc att 254
 Arg Asn Ile Thr Leu Leu Asn Gly Val Ala Ile Ile Val Gly Thr Ile
 50 55 60
 atc gcc tcg gcc atc ttc gtg acg ccc acg gcc gtg ctc aag gag gca 302
 Ile Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Pro Thr Gly Val Leu Lys Glu Ala
 65 70 75
 gcc tcg ccg ggg ctg gcg ctg gtg gtg tgg gcc gcg tgc gcc gtc ttc 350
 Gly Ser Pro Gly Leu Ala Leu Val Val Trp Ala Ala Cys Gly Val Phe
 80 85 90 95
 tcc atc gtg gcc gcg ctc tgc tac gcg gag ctc gcc acc acc atc tcc 398
 Ser Ile Val Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Thr Thr Ile Ser
 100 105 110
 aaa tcg gcc gcc gac tac gcc tac atg ctg gag gtc tac gcc tcg ctg 446
 Lys Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Met Leu Glu Val Tyr Gly Ser Leu
 115 120 125
 ccc gcc ttc ctc aag ctc tgg atc gag ctg ctc atc atc cgg cct tca 494
 Pro Ala Phe Leu Lys Leu Trp Ile Glu Leu Leu Ile Ile Arg Pro Ser
 130 135 140
 tcg cag tac atc gtg gcc ctg gtc ttc gcc acc tac ctg ctc aag ccg 542
 Ser Gln Tyr Ile Val Ala Leu Val Phe Ala Thr Tyr Leu Leu Lys Pro
 145 150 155
 ctc ttc ccc acc tgc ccg gtg ccc gag gag gca gcc aag ctc gtg gcc 590

ES 2 489 641 T3

Leu 160	Phe	Pro	Thr	Cys	Pro 165	Val	Pro	Glu	Glu	Ala 170	Ala	Lys	Leu	Val	Ala 175	
tgc Cys	ctc Leu	tgc Cys	gtg Val	ctg Leu	ctg Leu	ctc Leu	acg Thr	gcc Ala	gtg Val	aac Asn	tgc Cys	tac Tyr	agc Ser	gtg Val	aag Lys	638
gcc Ala	gcc Ala	acc Thr	cgg Arg	gtc Val	cag Gln	gat Asp	gcc Ala	ttt Phe	gcc Ala	gcc Ala	gcc Ala	aag Lys	ctc Leu	ctg Leu	gcc Ala	686
ctg Leu	gcc Ala	ctg Leu	atc Ile	atc Ile	ctg Leu	ctg Leu	ggc Gly	ttc Phe	gtc Val	cag Gln	atc Ile	ggg Gly	aag Lys	ggg Gly	gat Asp	734
gtg Val	tcc Ser	aat Asn	cta Leu	gat Asp	ccc Pro	aac Asn	ttc Phe	tca Ser	ttt Phe	gaa Glu	ggc Gly	acc Thr	aaa Lys	ctg Leu	gat Asp	782
gtg Val	ggg Gly	aac Asn	att Ile	gtg Val	ctg Leu	gca Ala	tta Leu	tac Tyr	agc Ser	ggc Gly	ctc Leu	ttt Phe	gcc Ala	tat Tyr	gga Gly	830
gga Gly	tgg Trp	aat Asn	tac Tyr	ttg Leu	aat Asn	ttc Phe	gtc Val	aca Thr	gag Glu	gaa Glu	atg Met	atc Ile	aac Asn	ccc Pro	tac Tyr	878
aga Arg	aac Asn	ctg Leu	ccc Pro	ctg Leu	gcc Ala	atc Ile	atc Ile	atc Ile	tcc Ser	ctg Leu	ccc Pro	atc Ile	gtg Val	acc Thr	ctg Leu	926
gtg Val	tac Tyr	gtg Val	ctg Leu	acc Thr	aac Asn	ctg Leu	gcc Ala	tac Tyr	ttc Phe	acc Thr	acc Thr	ctg Leu	tcc Ser	acc Thr	gag Glu	974
cag Gln	atg Met	ctg Leu	tgc Ser	tcc Ser	gag Glu	gcc Ala	gtg Val	gcc Ala	gtg Val	gac Asp	ttc Phe	ggg Gly	aac Asn	tat Tyr	cac His	1022
ctg Leu	ggc Gly	gtc Val	atg Met	tcc Ser	tgg Trp	atc Ile	atc Ile	ccc Pro	gtc Val	ttc Phe	gtg Val	ggc Gly	ctg Leu	tcc Ser	tgc Cys	1070
ttc Phe	ggc Gly	tcc Ser	gtc Val	aat Asn	ggg Gly	tcc Ser	ctg Leu	ttc Phe	aca Thr	tcc Ser	tcc Ser	agg Arg	ctc Leu	ttc Phe	ttc Phe	1118
gtg Val	ggg Gly	tcc Ser	cgg Arg	gaa Glu	ggc Gly	cac His	ctg Leu	ccc Pro	tcc Ser	atc Ile	ctc Leu	tcc Ser	atg Met	atc Ile	cac His	1166
cca Pro	cag Gln	ctc Leu	ctc Leu	acc Thr	ccc Pro	gtg Val	cgg Pro	tcc Ser	ctc Leu	gtg Val	ttc Phe	acc Thr	tgt Cys	gtg Val	atg Met	1214
acg Thr	ctg Leu	ctc Leu	tac Tyr	gcc Ala	ttc Phe	tcc Ser	aag Lys	gac Asp	atc Ile	ttc Phe	tcc Ser	gtc Val	atc Ile	aac Asn	ttc Phe	1262
ttc Phe	agc Ser	ttc Phe	ttc Phe	aac Asn	tgg Trp	ctc Leu	tgc Cys	gtg Val	gcc Ala	ctg Leu	ggc Ala	atc Ile	atc Ile	ggc Gly	atg Met	1310
atc Ile	tgg Trp	ctg Leu	cgc Arg	cac His	aga Arg	aag Lys	cct Pro	gag Glu	ctt Leu	gag Glu	cgg Arg	ccc Pro	atc Ile	aag Lys	gtg Val	1358
aac Asn	ctg Leu	gcc Ala	ctg Leu	cct Pro	gtg Val	ttc Phe	ttc Phe	atc Ile	ctg Leu	ggc Ala	tgc Cys	ctc Leu	ttc Phe	ctg Leu	atc Ile	1406
gcc Ala	gtc Val	tcc Ser	ttc Phe	tgg Trp	aag Lys	aca Thr	ccc Pro	gtg Val	gag Glu	tgt Cys	ggc Gly	atc Ile	ggc Gly	ttc Phe	acc Thr	1454
atc atc	ctc ctc	agc agg	ctg ctg	ccc ccc	gtc gtc	tac tac	ttc ttc	ttc ttc	ggg ggg	gtc gtc	tgg tgg	tgg tgg	aaa aaa			1502

ES 2 489 641 T3

Ile	Ile	Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Tyr	Phe	Phe	Gly	Val	Trp	Trp	Lys	
465						470					475					
aac	aag	ccc	aag	tgg	ctc	ctc	cag	ggc	atc	ttc	tcc	acg	acc	gtc	ctg	1550
Asn	Lys	Pro	Lys	Trp	Leu	Leu	Gln	Gly	Ile	Phe	Ser	Thr	Thr	Val	Leu	
480					485				490					495		
tgt	cag	aag	ctc	atg	cag	gtg	gtc	ccc	cag	gag	aca	tagccaggag				1596
Cys	Gln	Lys	Leu	Met	Gln	Val	Val	Pro	Gln	Glu	Thr					
				500				505								
gccgagtggc	tgccggagga	gcatgocgag	aggccagtta	aagtagatca	octoctogaa											1656
cccactccgg	ttccccgaa	cccacagctc	agctgoccat	cccagtcct	cgccgtccct											1716
cccaggtogg	gcagtgagg	ctgotgtgaa	aactctggta	cgaatctcat	ccctcaactg											1776
agggccaggg	accaggtgt	gcctgtgctc	ctgccagga	gcagctttg	gtctccttgg											1836
gcccttttc	cctccctcc	ttgtttaact	tatatata	tttttttaa	acttaaattt											1896
tgggtcaact	tgacaccact	aagatgattt	ttaaggagc	tgggggaagg	caggagcctt											1956
cctttctcct	gccccaggg	cccagaccct	gggcaaacag	agctactgag	acttggaaac											2016
tcattgttac	gacagacttg	cactgaagcc	ggacagctgc	ccagacacat	gggcttgtga											2076
cattcgtgaa	aaccaaccct	gtgggcttat	gtctctgcct	tagggtttgc	agagtggaaa											2136
ctcagccgta	gggtggcact	gggagggggt	gggggatctg	ggcaaggtgg	gtgattcctc											2196
ccaggaggtg	cttgaggccc	cgatggactc	ctgaccataa	tcctagcccc	gagacaccat											2256
cctgagccag	ggaacagccc	cagggttggg	gggtgcoggc	atctccccta	gtcaccagg											2316
cctggcctct	gggcagtgtg	gcctcttggc	tattctgtt	ccagtttgg	aggctgagtt											2376
ctggttcatg	cagacaaaagc	cctgtccttc	agtctctag	aaacagagac	aagaaaggca											2436
gacacaccgc	ggccaggcac	ccatgtgggc	gccccocctg	ggctccacac	agcagtgtcc											2496
cctgccccag	aggtgcagc	taccctcagc	ctocaaatga	ttggcctctg	tacogccogg											2556
cagoccttc	tggccgtg	tgggttcca	ctccggcct	aggcacctcc	ccgctctccc											2616
tgtaccgtc	atgtcctgtc	ctggctctga	tgcccttgt	ctaggagaca	gagccaagca											2676
ctgotcaogt	ctctgccgoc	tgcgtttgga	ggcccctggg	ctctcaccca	gtccccaccc											2736
gcctgcagag	agggaactag	ggcacocctt	gtttctgtt	ttcccgtaa	tttttttgc											2796
tatgggaggc	agccgaggcc	tggccaatgc	ggcccacttt	cctgagctgt	cgctgcctcc											2856
atggcagcag	ccaaggaccc	ccagaacaag	aagacccccc	cgcaggatcc	ctctgagct											2916
cggggggctc	tgccttctca	ggccccgggc	ttcccttctc	cccagccaga	ggtggagcca											2976
agtggctcag	cgtaactcca	gtgctcagct	gtggctggag	gagctggcct	gtggcacagc											3036
cctgagtgtc	ccaagccggg	agccaacgaa	gcoggacacg	gcttcaactga	ccagcggctg											3096
ctcaagccgc	aagctctcag	caagtgccca	gtggagcctg	ccgccccac	ctgggcacog											3156
ggacccccctc	accatccagt	gggcccggag	aaacctgatg	aacagtttgg	ggactcagga											3216
ccagatgtcc	gtctctcttg	cttgaggaat	gaagaccitt	attcaccocct	gccccgttgc											3276
ttcccgtg	acatggacag	acttcaacgc	gtctgtctcat	aggacotgca	tccttctctg											3336
ggacgaattc	cactcgtcca	agggacagcc	cacggtctgg	aggccgagga	ccaccagcag											3396
gcaggttggac	tactgtgtt	gggcaagacc	tcttccctct	gggctgttc	tottggctgc											3456
aaataaggac	agcagctggt	gccccacctg	cctgggtcat	tgtgtgtga	atccaggagg											3516
cagtggacat	cgtaggcagc	caoggccccg	ggtccaggag	aagtctccc	tggaggcagc											3576

caccaactgct tcccaactggg gccggcgggg cccacgcacg acgtcagcct cttacottco 3636
 cgcctcggct aggggtcctc gggatgccgt tctgttcaa cctcctgctc tgggaggtgg 3696
 acatgcctca aggatacagg gagccggcgg cctctcgacg gcacgcactt goctgttggc 3756
 tgctcgggct gtgggcgagc atggggctg ccagcgtctg ttgtggaag tagctgctag 3816
 tgaaatggct ggggcgctg gggccgtct tcacactcg caggtctott ctggcgtct 3876
 gagctgggggt gggagctcct ccgcagaagg ttggtggggg gtccagtctg tgatcottgg 3936
 tgctgtgtgc cccactccag cctggggacc ccaactcaga aggtaggggc cgtgtcccgc 3996
 ggtgtgact gaggcctgct tccccctccc cctcctgctg tgctggaatt ccacagggac 4056
 cagggccacc gcaggggact gtctcagaag acttgatitit toogtccott tttctccaca 4116
 ctccactgac aaacgtcccc agcggtttcc acttgtgggc ttcaggtgtt ttoaagcaca 4176
 acccaocaca acaagcaagt gcattitcag togttgtgct tttttgtttt gtgtaaacgt 4236
 cttactaatt taagatgct gtcggcacca tgtttattta ttlocagtgg tcatgctcag 4296
 ccttctgct ctgcgtggcg caggtgccat gcctgctccc tctctgtgtc ccagccacgc 4356
 agggccatcc actgtgacgt cggccgacca ggctggacac cctctgcga gtaatgacgt 4416
 gtgtggctgg gacottcttt attctgtgtt aatggotaac ctgttacact gggctgggtt 4476
 gggtagggtg ttctggottt tttgtgggt tttattttt aaagaaacac tcaatcatcc 4536
 tag 4539

<210> 68
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 68

Met Ala Gly Ala Gly Pro Lys Arg Arg Ala Leu Ala Ala Pro Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Glu Lys Glu Glu Ala Arg Glu Lys Met Leu Ala Ala Lys Ser Ala
 20 25 30
 Asp Gly Ser Ala Pro Ala Gly Glu Gly Glu Gly Val Thr Leu Gin Arg
 35 40 45
 Asn Ile Thr Leu Leu Asn Gly Val Ala Ile Ile Val Gly Thr Ile Ile
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Pro Thr Gly Val Leu Lys Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Ser Pro Gly Leu Ala Leu Val Val Trp Ala Ala Cys Gly Val Phe Ser
 85 90 95
 Ile Val Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Thr Thr Ile Ser Lys
 100 105 110
 Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Met Leu Glu Val Tyr Gly Ser Leu Pro
 115 120 125
 Ala Phe Leu Lys Leu Trp Ile Glu Leu Leu Ile Ile Arg Pro Ser Ser

10

ES 2 489 641 T3

gcagtatggt agctcacctc tattcacttt cggccctggg acc

5 <210> 73
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 73
 ccggaattca acactctccc ctgttgaagc tctttgtgac gg 42

15 <210> 74
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 74
 ggtcccaggg ccgaaagtga acataggtga gctaccatac tgctg 45

25 <210> 75
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 75
 gcagtatggt agctcaccta tgttacttt cggccctggg acc 43

35 <210> 76
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador

<400> 76
 45 ccggaattca acactctccc ctgttgaagc tctttgtgac gg 42

<210> 77
 <211> 133
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena L del anticuerpo C2IgG1NS/117IL

55 <400> 77

ES 2 489 641 T3

Arg Ser Leu Thr Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 20 25 30
 Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 35 40 45
 Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
 65 70 75 80
 Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
 115 120 125
 Lys Val Asp Ile Lys
 130

- 5 <210> 78
- <211> 399
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Región variable de cadena L del anticuerpo C2IgG1NS/117IL
- <400> 78

```

agatctctca ccatggaaac cccagcgcag cttctcttcc tctgtctact ctggctccca    60
gataccaccg gagaaattgt gttgaogcag totccaggca ccctgtcttt gtctccaggg    120
gaaagagcoa ccctctcctg cagggccagt cagagtgtta gcagcagctt ottagcctgg    180
taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctctcatct atggtgcacg cagcagggcc    240
actggcatcc cagacagggt cagtggcagt gggctctggga cagacttcac tctcaccatc    300
agcagactgg agcctgaaga tttcgcagtg tattactgtc agcagtatgg tagctcacct    360
ctattcaett tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa                                399
  
```

- 15 <210> 79
- <211> 133
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 20 <220>
- <223> Región variable de cadena L del anticuerpo C2IgG1NS/117IM
- <400> 79

25

ES 2 489 641 T3

Arg Ser Leu Thr Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 20 25 30
 Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 35 40 45
 Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
 65 70 75 80
 Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
 115 120 125
 Lys Val Asp Ile Lys
 130

<210> 80
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Región variable de cadena L del anticuerpo C2IgG1NS/117IM

10

<400> 80

agatctotca ccatggaac cccagcgag ctctcttcc tcctgtact ctggctcca 60
 gataccaccg gaaaaattgt gttgacgag totcaggca ccctgtctt gtctccaggg 120
 gaaagagcca ccctctctg cagggccagt cagagtgtta gcagcagott cttagcotgg 180
 taccagcaga aacctggcca ggtcccagg ctctcatct atggtgcatc cagcagggcc 240
 actggcatcc cagacaggtt cagtggcagt gggctctggga cagacttac tctcaccatc 300
 agcagactgg agcctgaaga ttogcagtg tattactgtc agcagtatgg tagctcacct 360
 atgttcactt tggccctgg gaccaaagt gatataaaa 399

15 <210> 81
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Región variable de cadena L del anticuerpo C2IgG1NS/177IN

<400> 81

ES 2 489 641 T3

Arg Ser Leu Thr Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 20 25 30
 Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 35 40 45
 Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
 65 70 75 80
 Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Asn Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
 115 120 125
 Lys Val Asp Ile Lys

5 <210> 82
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena L del anticuerpo C2IgG1NS/117IN

<400> 82
 agatctctca coactggaac cccagcgcag ctctctctcc tctgtctact ctggctccca 60
 gataccaccg gagaaattgt gttgacgcag totccaggca cctgtcttt gtctccaggg 120
 gaaagagcca cctctctctg cagggccagt cagagtgtta goagcagctt cttagcctgg 180
 taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctctatct atggtgcac cagcagggcc 240
 actggcatcc cagacaggtt cagtggcagt gggtctggga cagacttcac tctcacoatc 300
 agcagactgg agcctgaaga ttctgcagtg tattactgtc agcagtatgg tagctcact 360
 aatttcaatt toggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 399

15 <210> 83
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Región variable de cadena L del anticuerpo C2IgG1NS/117IC

<400> 83

ES 2 489 641 T3

Arg Ser Leu Thr Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 20 25 30
 Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 35 40 45
 Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
 65 70 75 80
 Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Cys Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
 115 120 125
 Lys Val Asp Ile Lys
 130

5 <210> 84
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena L del anticuerpo C2IgG1NS/117IC
 <400> 84

agatctctca ccattgaaac cccagcgcag cttctcttcc tctgtctact ctggctcca 60
 gataccacog gagaaattgt gttgacgcag tctccaggca ccotgtcttt gtctccaggg 120
 gaaagagcca ccotctctctg cagggccagt cagagtgtta gcagcagott cttagcotgg 180
 taccagcaga aacctggcca ggtcccagg ctctctcatct atggtgcato cagcagggcc 240
 actggcatcc cagacaggtt cagtggcagt gggctctggga cagacttcaoc tctcaccatc 300
 agcagactgg agcctgaaga tttcgcagtg tattactgtc agcagtatgg tagctcacct 360
 tgtttcaactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 399

15 <210> 85
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido

25 <400> 85
 ccgagagacc cacccttga ggctccagat ttatc 35

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal humano o fragmento funcional del mismo, que presenta cualquier par de secuencias de (b) a (g) a continuación a modo de región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera:
- 5 (b) SEC ID nº 41 y 47,
 (c) SEC ID nº 43 y 47,
 (d) SEC ID nº 43 y 77,
 (e) SEC ID nº 43 y 79,
 10 (f) SEC ID nº 43 y 81, y
 (g) SEC ID nº 43 y 83.
2. Anticuerpo monoclonal humano o fragmento funcional del mismo según la reivindicación 1, en el que el fragmento funcional se selecciona de entre el grupo que consiste de Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, Fv unido mediante disulfuro y scFv del anticuerpo.
- 15 3. Conjugado, que comprende:
 el anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo según la reivindicación 1 ó 2, y un dominio heterogéneo que contiene una proteína de unión, un enzima, un fármaco, una toxina, un inmunomodulador, una parte detectable o una etiqueta.
- 20 4. Ácido nucleico, que presenta la secuencia de un fragmento BglII-BsiWI y un fragmento Sall-NheI contenido en el vector plásmido C2IgG1/pCR4 (FERM nº BP-10551), que no contiene ninguna secuencia del vector pCR4.
- 25 5. Ácido nucleico, que presenta la secuencia contenida en el vector plásmido C2IgG1/pCR4 (FERM nº BP-10551) y que codifica la región variable del anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1.
6. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 4 ó 5.
7. Célula que expresa el anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo según la reivindicación 1 ó 2.
- 30 8. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo según la reivindicación 1 ó 2 a modo de ingrediente activo.
- 35 9. Agente preventivo o terapéutico que comprende el anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo según la reivindicación 1 ó 2 a modo de ingrediente activo, para la utilización en la prevención o el tratamiento de un tumor.
- 40 10. Agente preventivo o terapéutico según la reivindicación 9 para la utilización según la reivindicación 9, en el que el tumor contiene una célula de cáncer que expresa CD98 en forma de un complejo con LAT1.
11. Anticuerpo monoclonal humano o fragmento funcional del mismo según la reivindicación 1 ó 2 ó la composición farmacéutica según la reivindicación 8, para la utilización en la prevención o el tratamiento de un tumor.
- 45 12. Agente terapéutico o preventivo según la reivindicación 9 para la utilización según la reivindicación 9 ó el anticuerpo o la composición farmacéutica según la reivindicación 11 para la utilización según la reivindicación 11, en el que el tumor es cáncer colorrectal o cáncer de colon.
- 50 13. Método para producir un anticuerpo, que comprende: introducir el vector según la reivindicación 6 en un huésped, cultivar el huésped y obtener el anticuerpo a partir del cultivo.
- 55 14. Método para producir un anticuerpo, que comprende: introducir un vector de expresión en un huésped, conteniendo el vector de expresión cualquier par de secuencias de (b) a (g) a continuación:
 (b) SEC ID nº 40 y 46,
 (c) SEC ID nº 42 y 46,
 (d) SEC ID nº 42 y 78,
 (e) SEC ID nº 42 y 80,
 (f) SEC ID nº 42 y 82, y
 (g) SEC ID nº 42 y 84,
- 60 o una secuencia de nucleótidos degenerada de las mismas, en un huésped, cultivar el huésped, y obtener el anticuerpo a partir del cultivo.

15. Método según la reivindicación 13 ó 14, en el que el huésped se selecciona de entre el grupo que consiste de *E. coli*, células de levadura, células de insecto, células de mamífero, células vegetales, plantas y mamíferos.
- 5 16. Utilización del anticuerpo monoclonal humano o fragmento funcional del mismo según la reivindicación 1 ó 2, para la preparación de un agente preventivo o un agente terapéutico para la prevención o tratamiento de un tumor.
- 10 17. Utilización según la reivindicación 16, en la que el tumor contiene una célula de cáncer que expresa CD98 en forma de un complejo con LAT1.
18. Utilización según la reivindicación 16, en la que el tumor es cáncer colorrectal o un cáncer de colon.

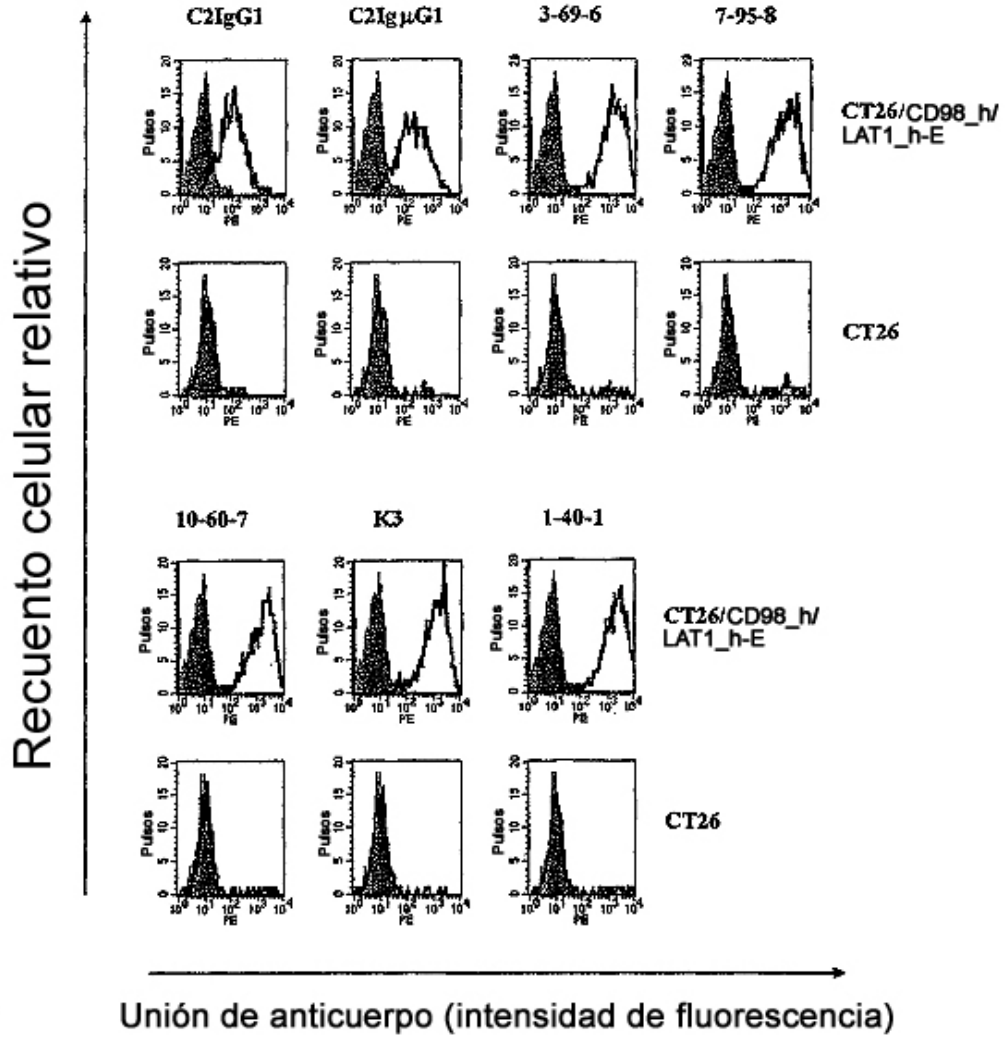


Fig.1

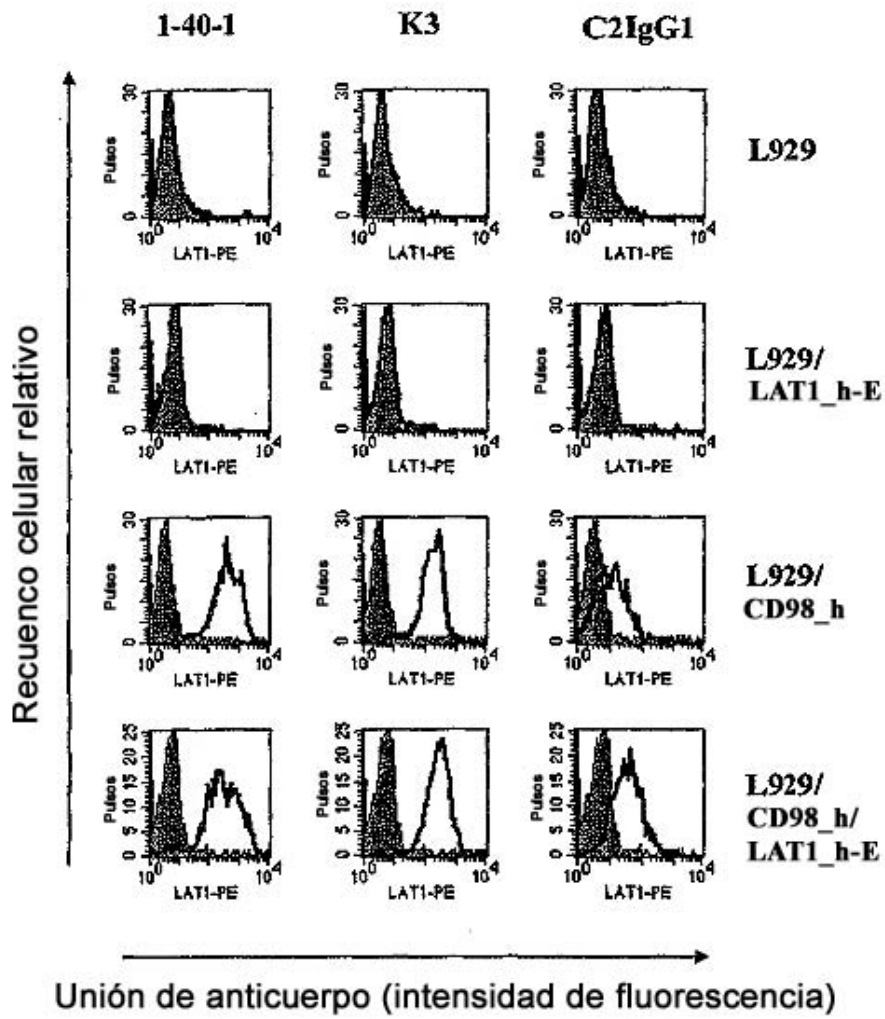


Fig.2A

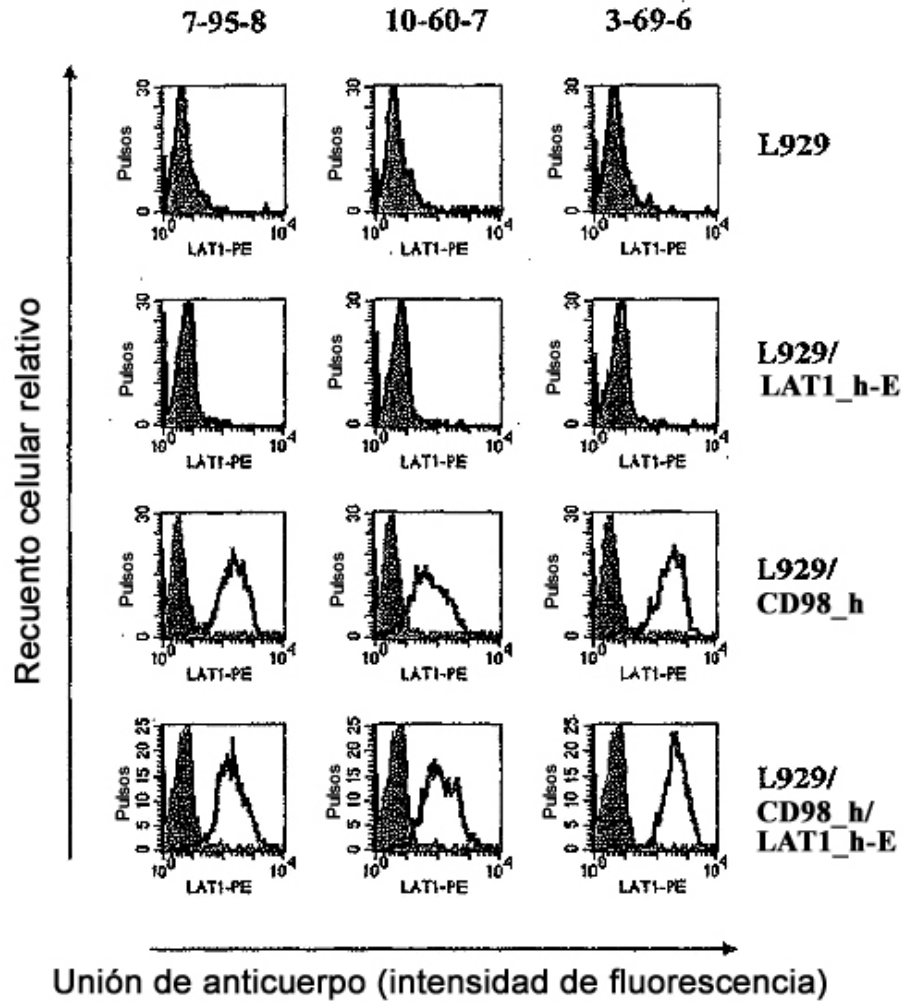


Fig.2B

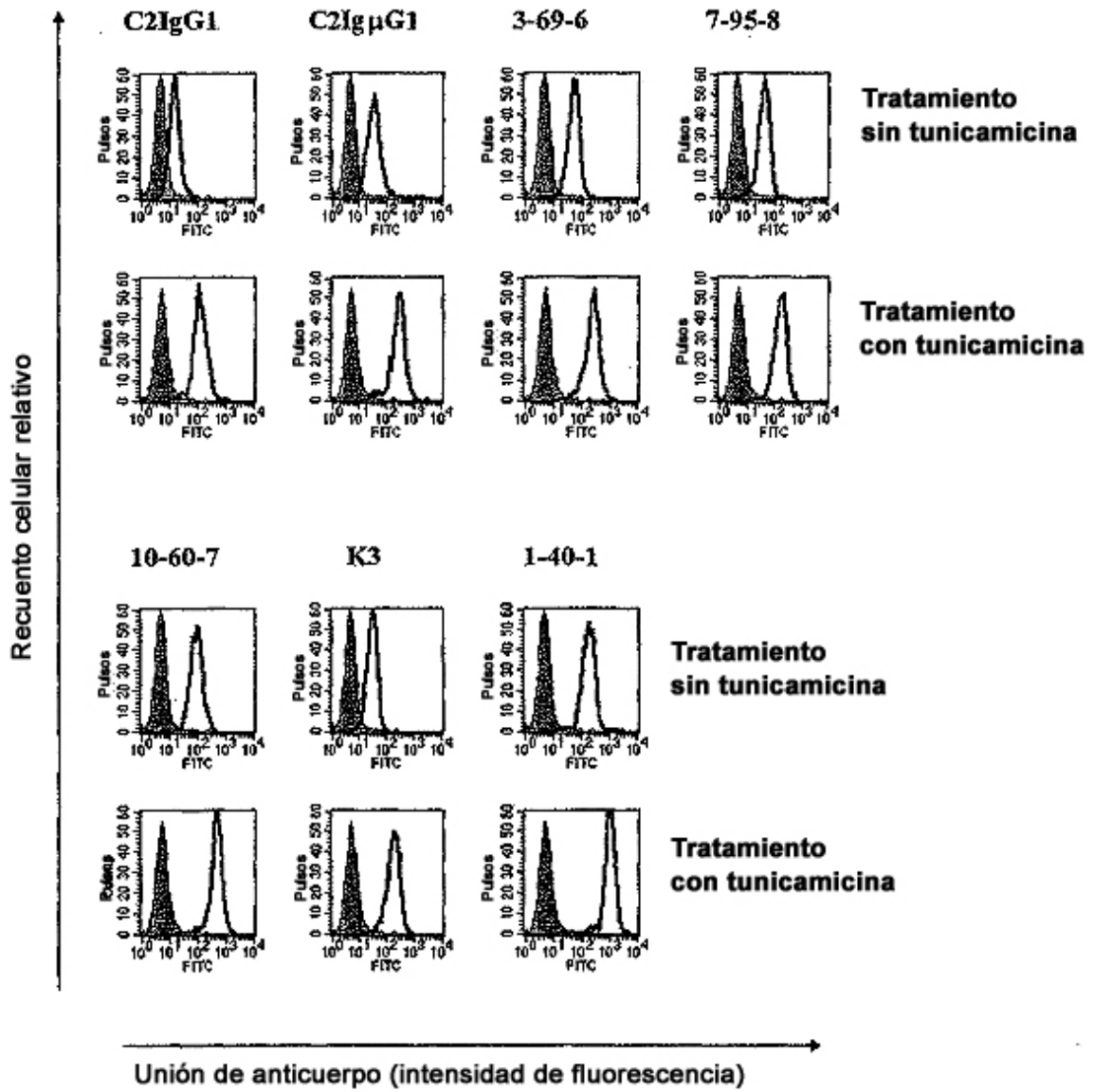


Fig.3

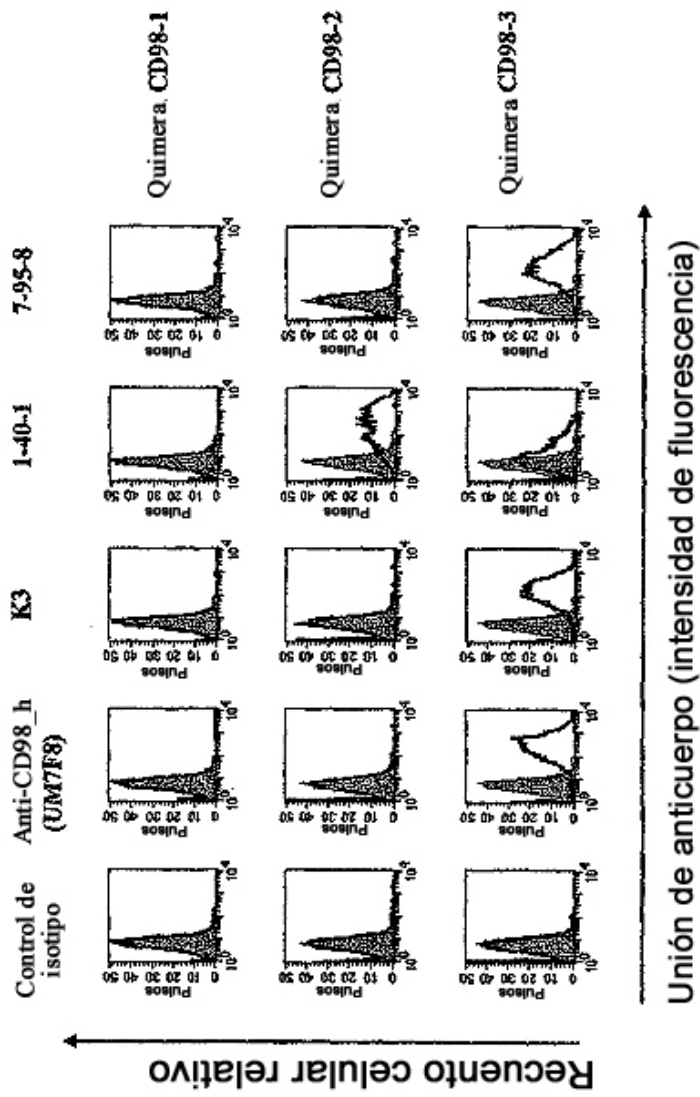


Fig. 4A

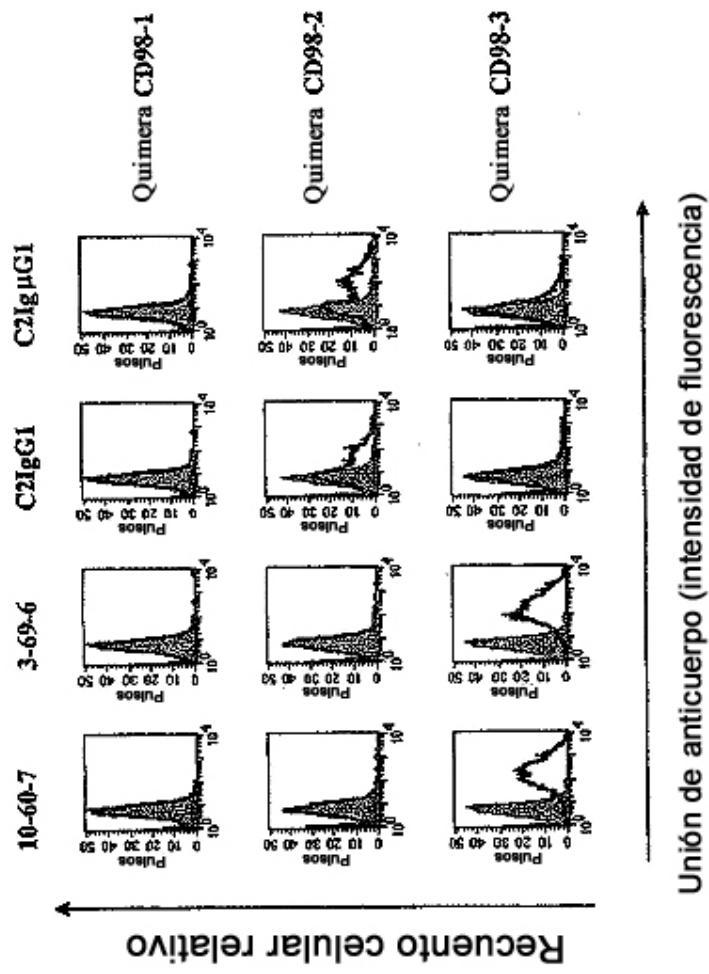


Fig.4B

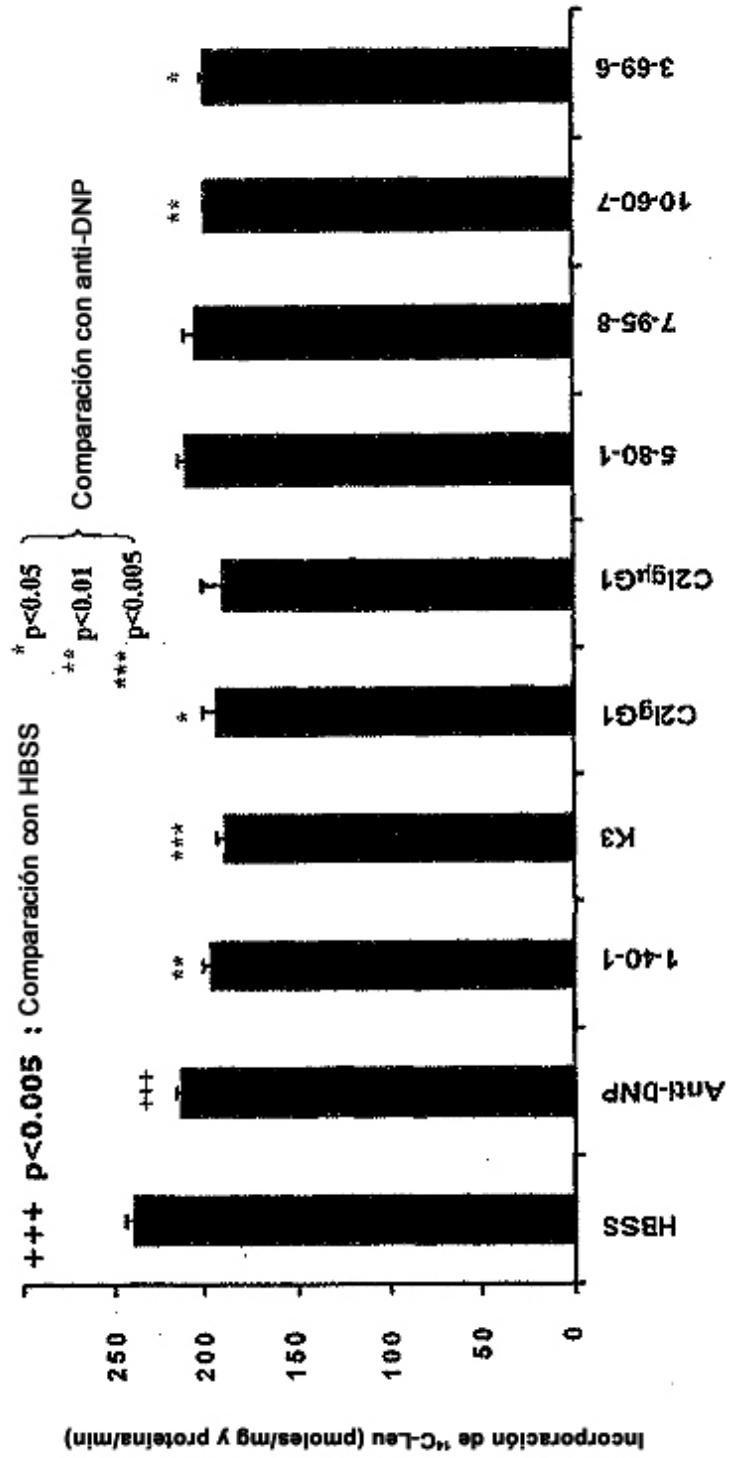


Fig.5

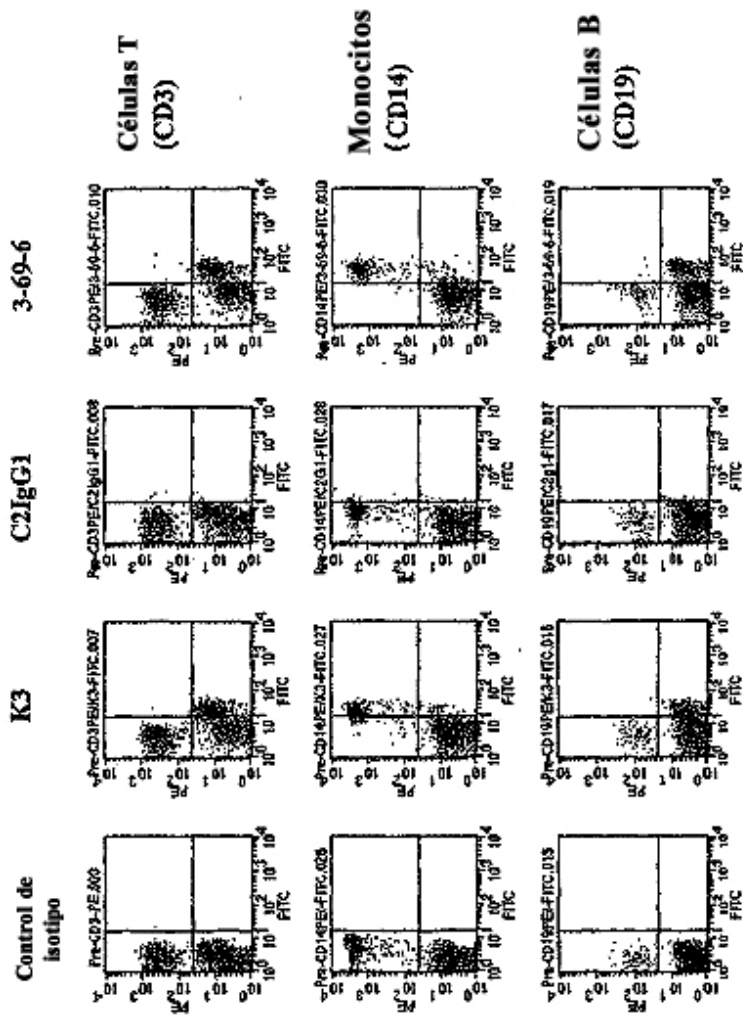


Fig.6A

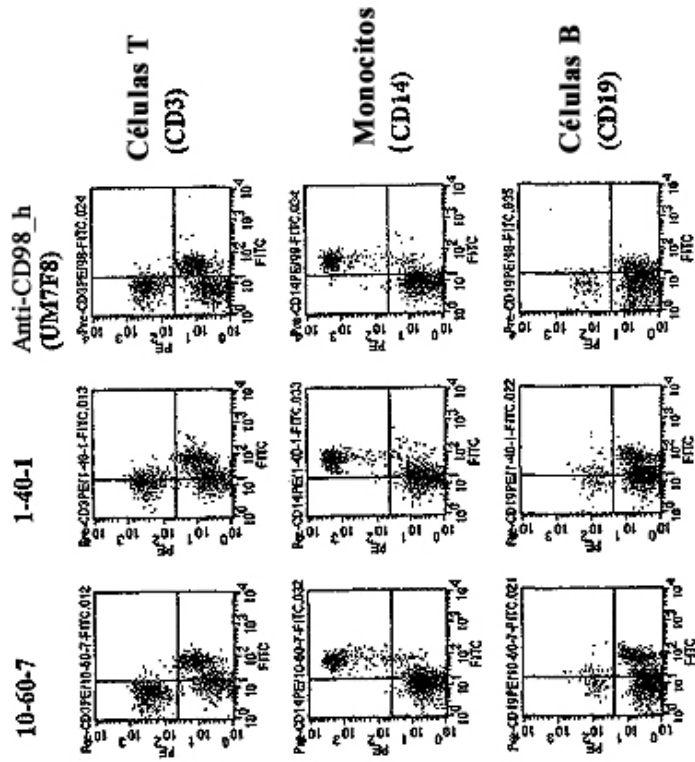


Fig.6B

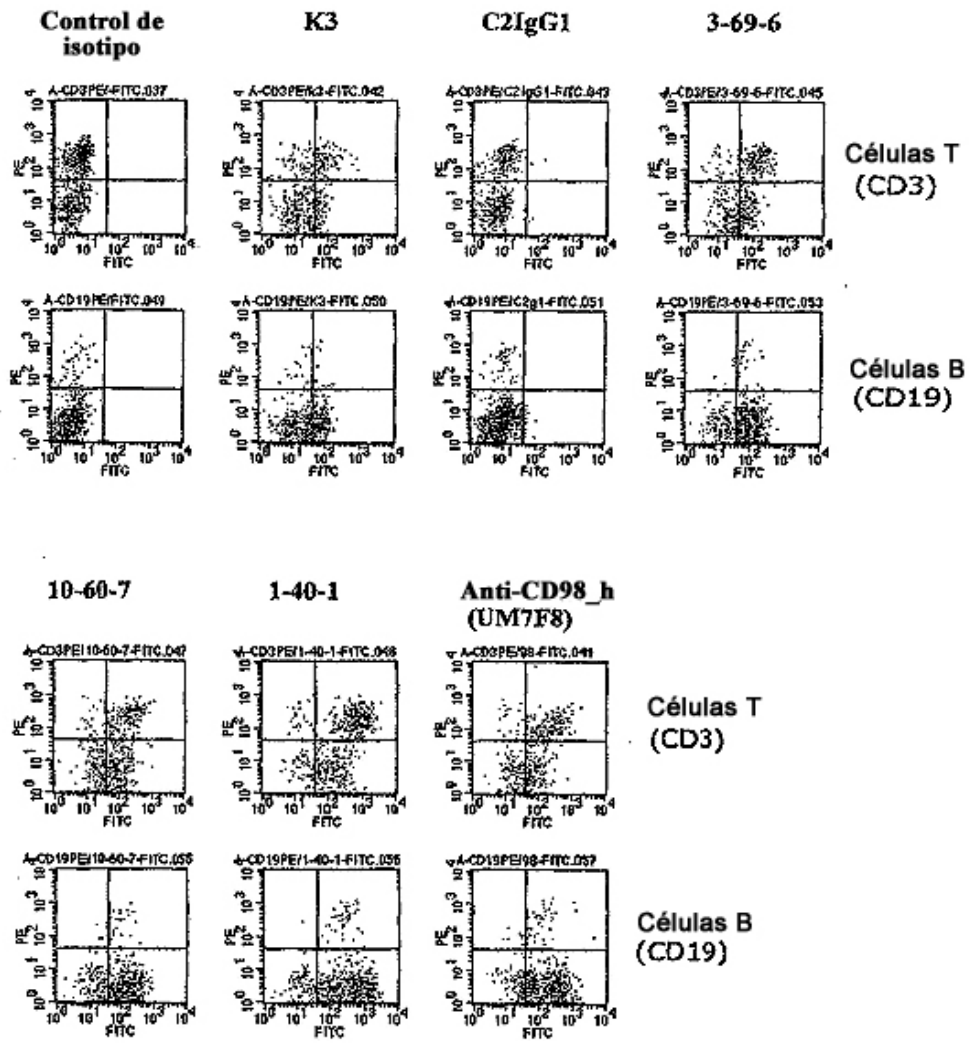
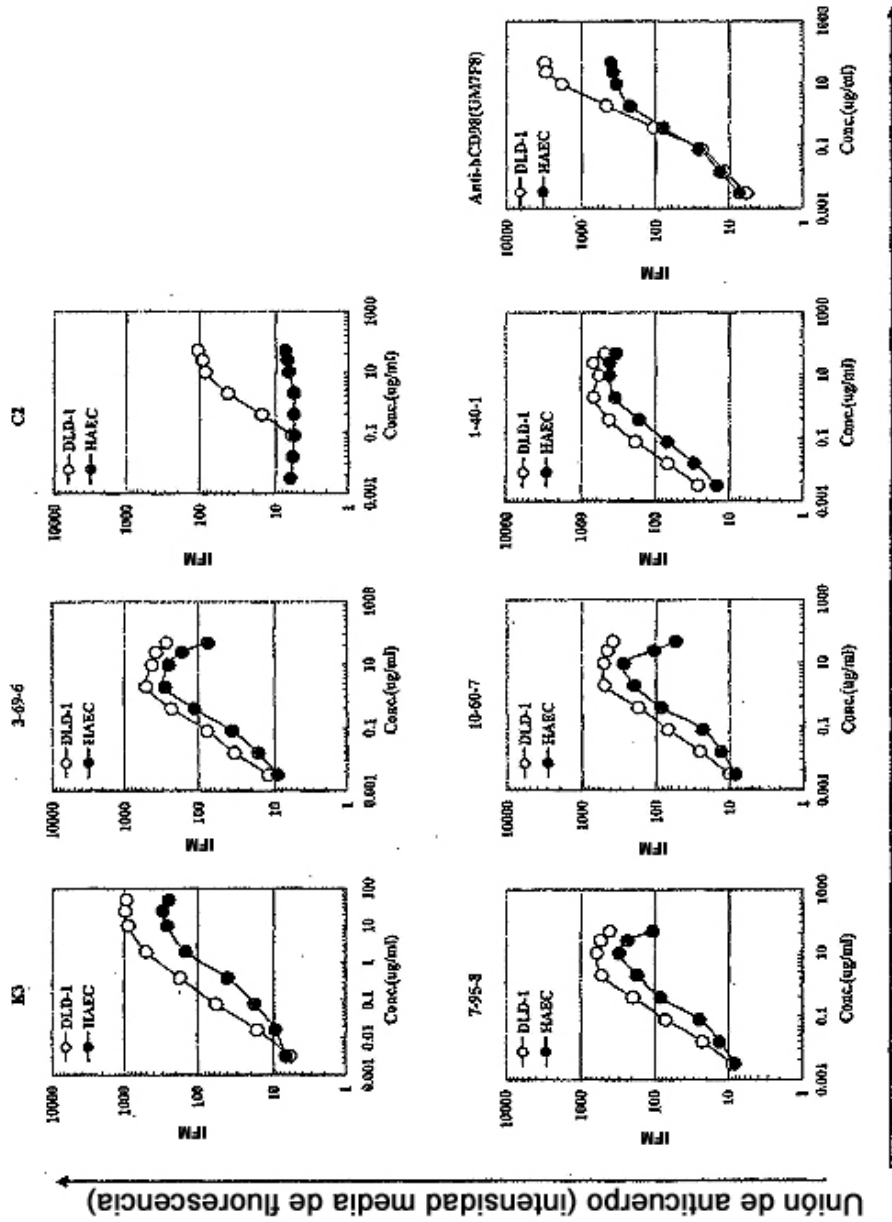


Fig.7



Concentración de anticuerpo

Fig.8

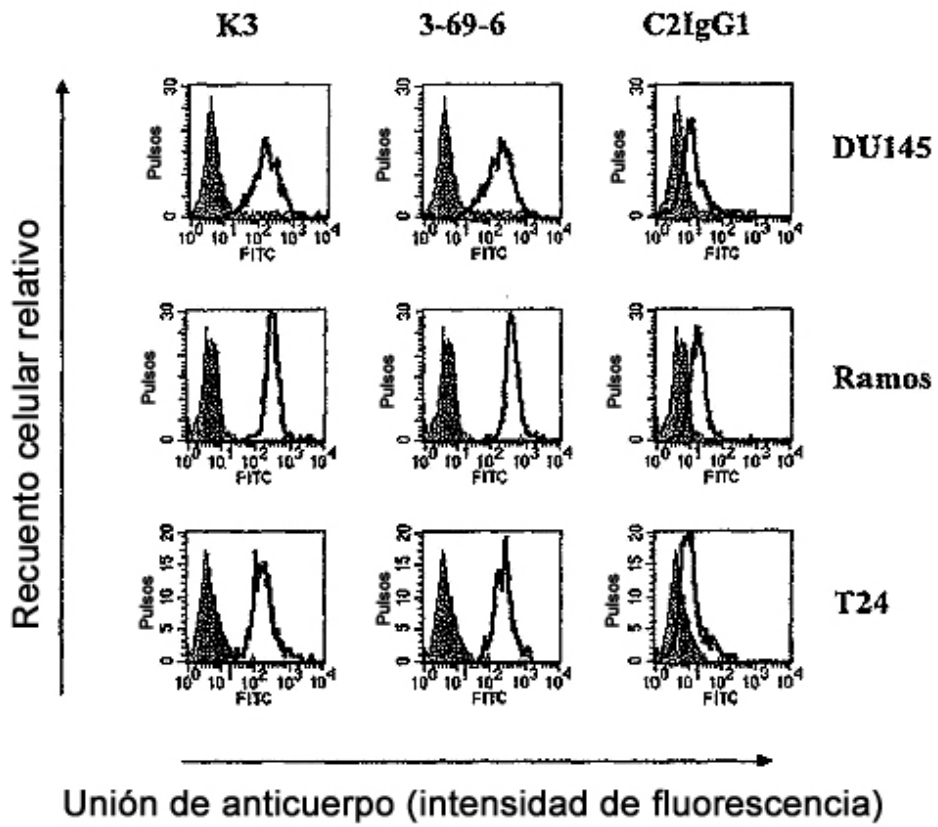


Fig.9A

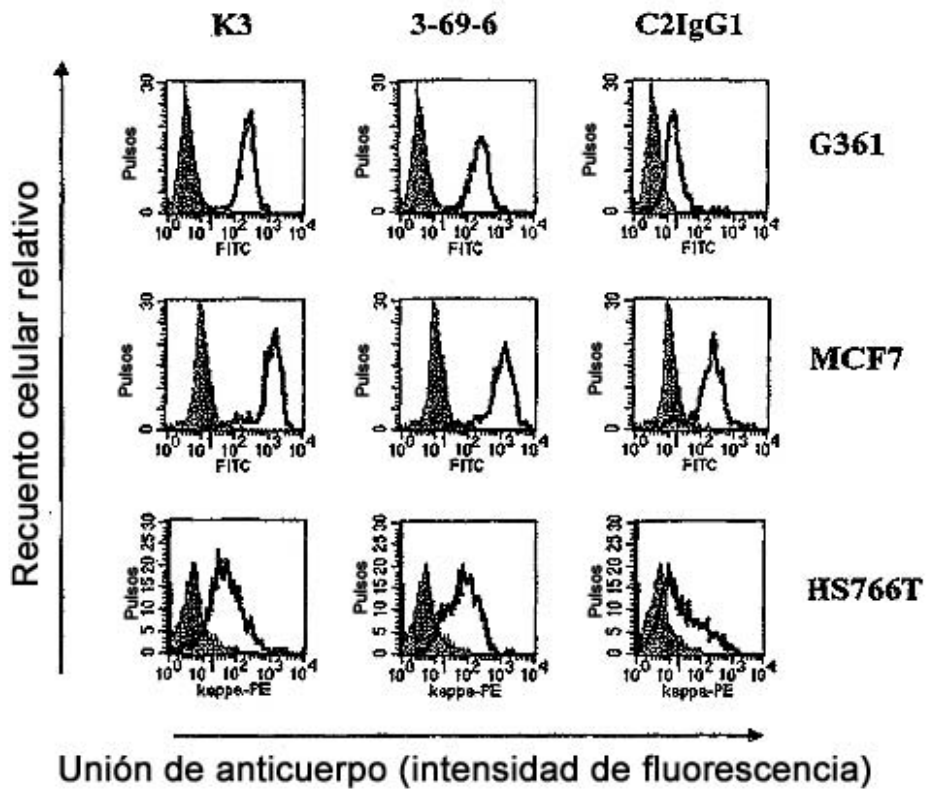


Fig.9B

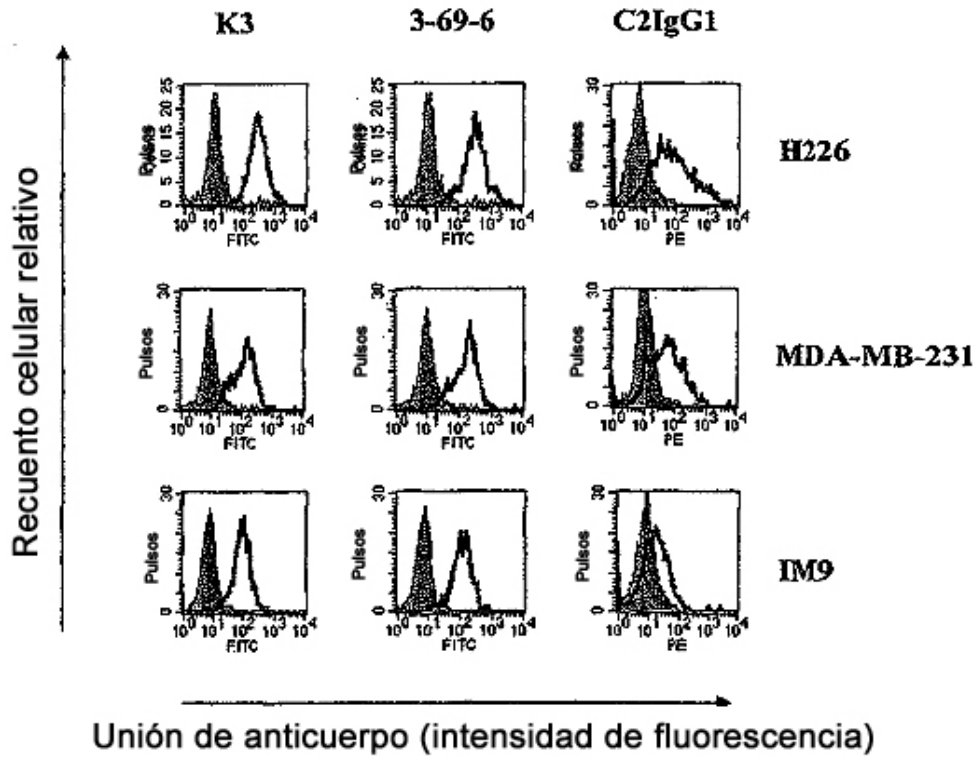


Fig.10A

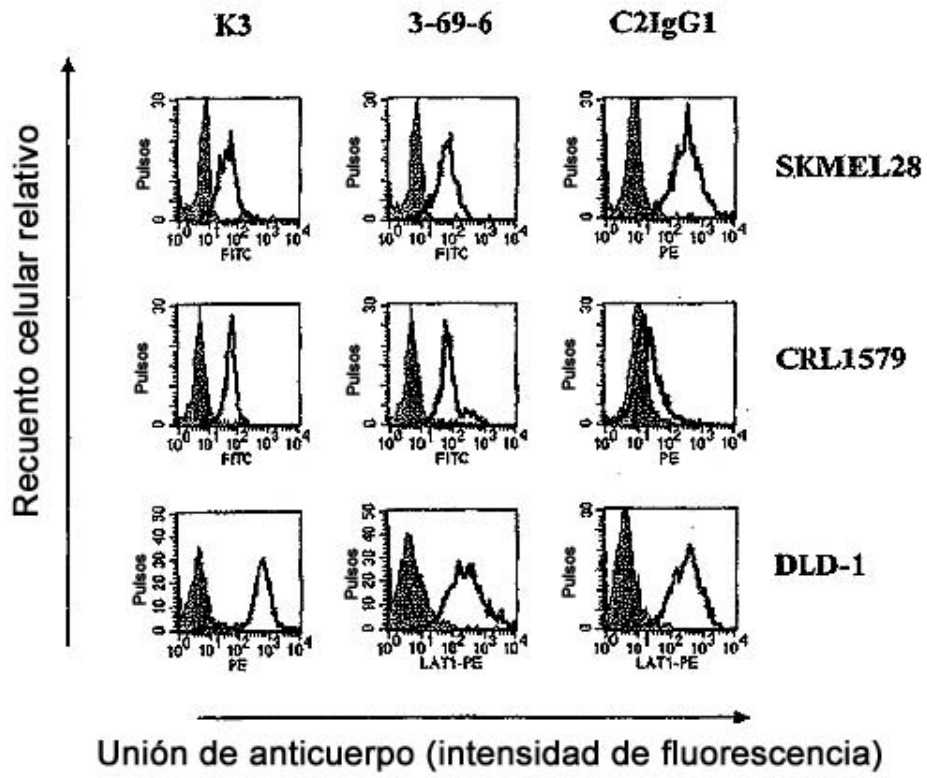
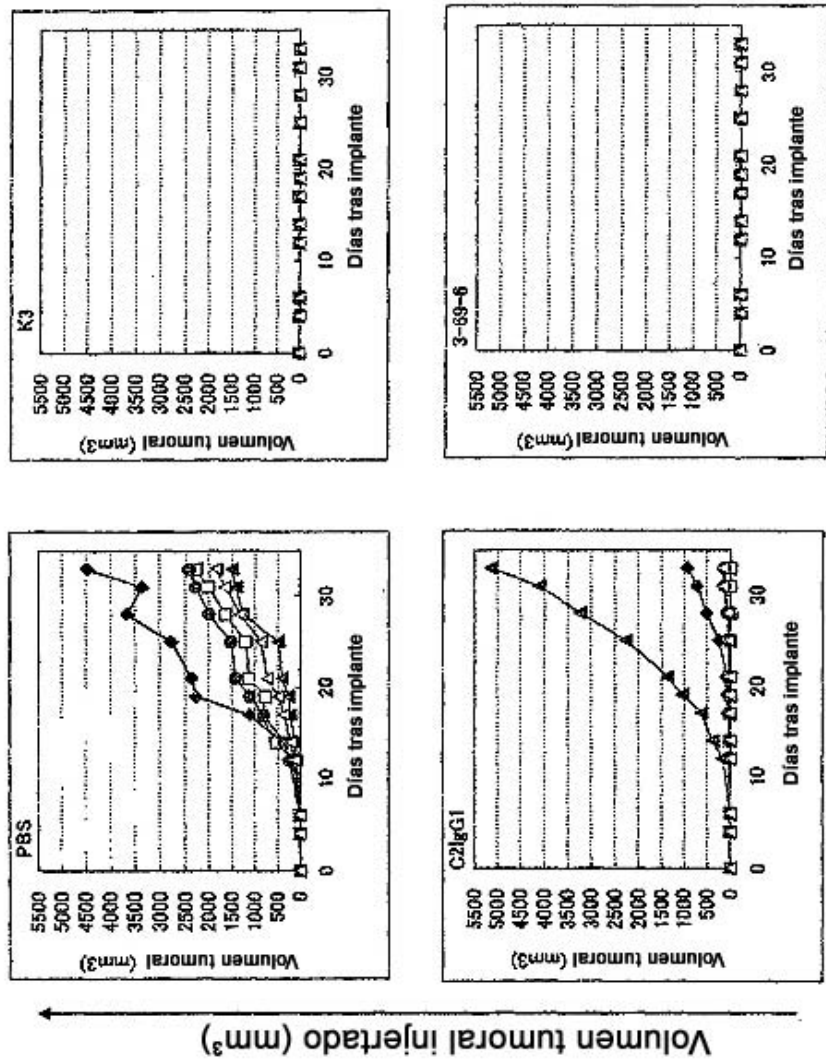


Fig.10B



Días después del trasplante de células de cáncer (días)

Fig.11

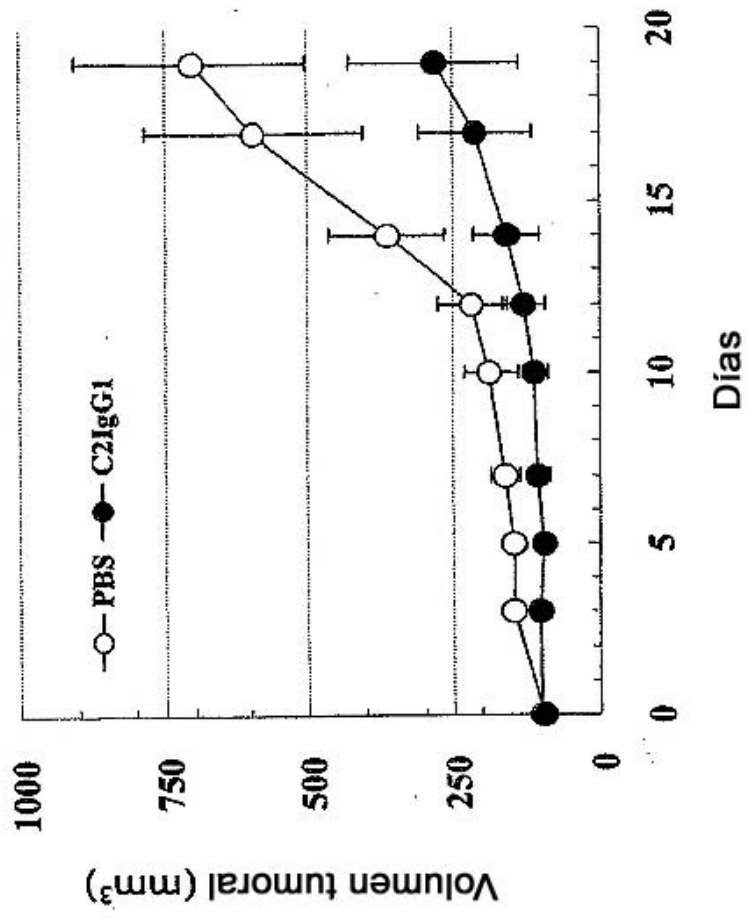


Fig.12

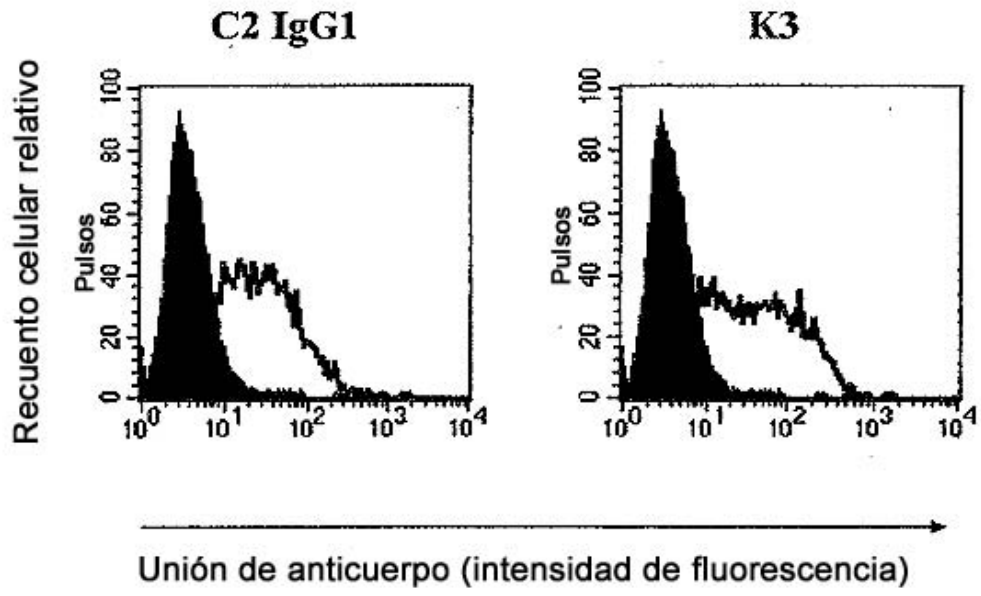


Fig.13

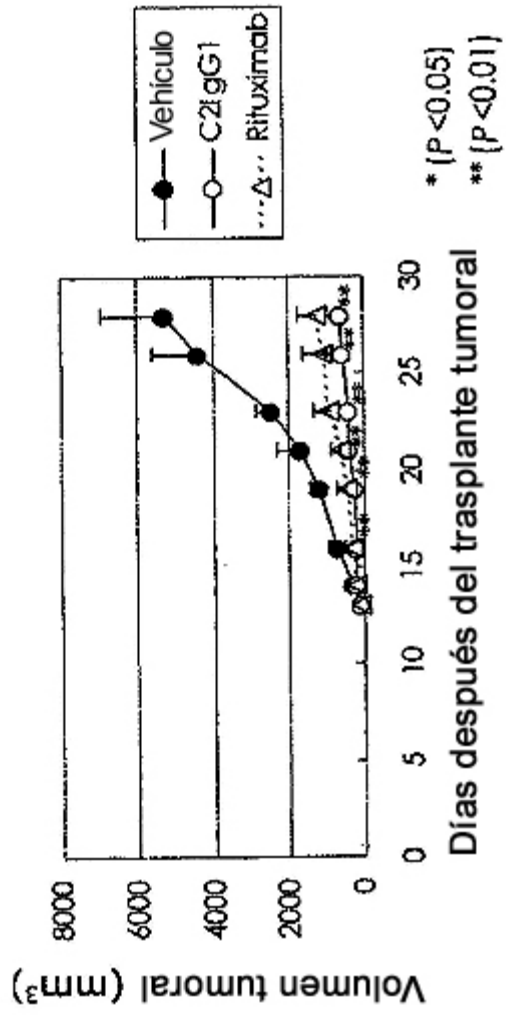


Fig.14

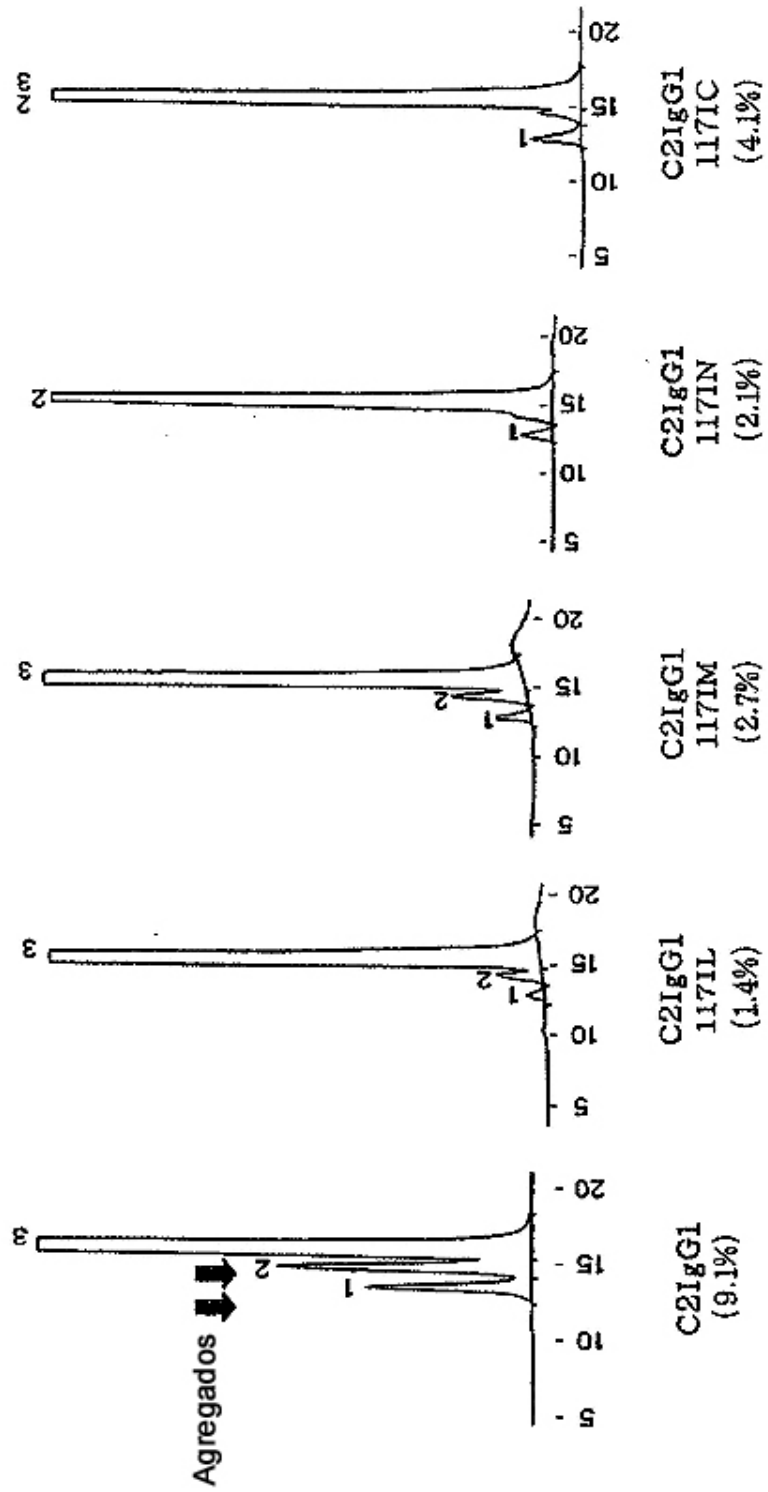


Fig.15

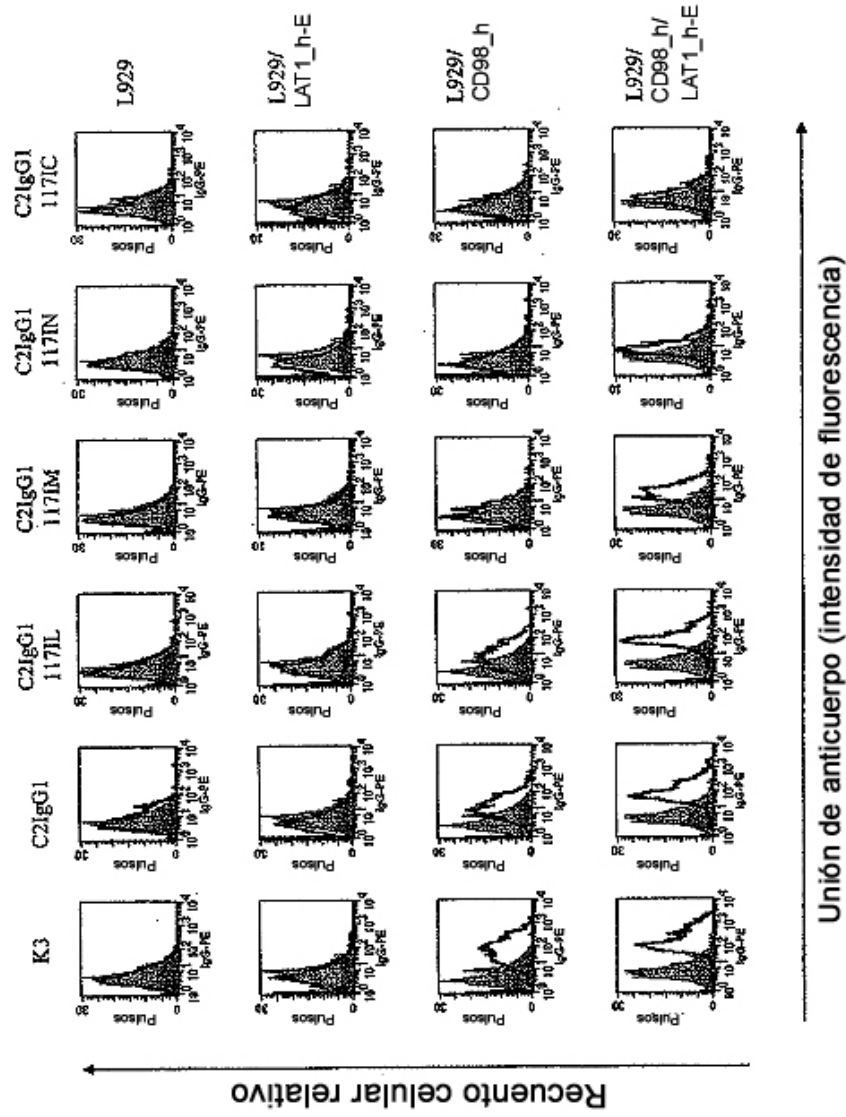
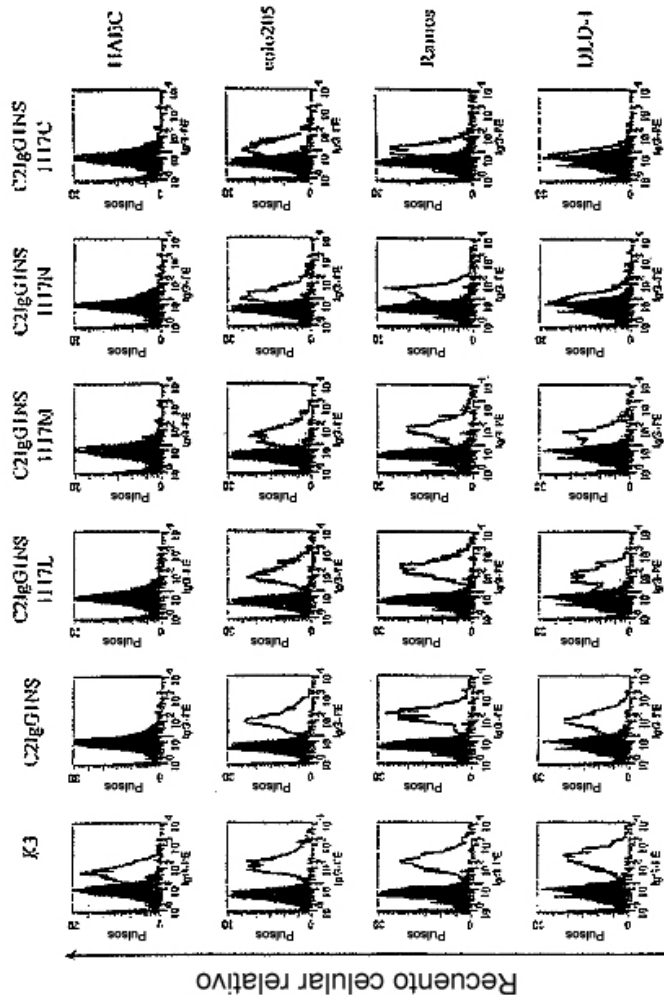


Fig.16A



Unión de anticuerpo (intensidad de fluorescencia)

Fig. 16B